

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Efectos del clofibrato sobre el metabolismo lipídico de
Ceratitis Capitata durante el desarrollo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Jaime Priego Fernández del Campo

DIRECTORES:

R. E. Catalán
Ángel Martín Municio

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFFECTOS DEL CLOFIBRATO SOBRE EL

METABOLISMO LIPÍDICO DE CERATITIS

CAPITATA DURANTE EL DESARROLLO

MEMORIA

que para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

presenta

JAIME PRIEGO FERNANDEZ DEL CAMPO

MADRID, 1977

T. 577-115
PRI
efe



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310043654

I N D I C E

Página

1.	PARTE TEORICA..	
1.1.	INTRODUCCION	1
1.2.	AGENTES HIPOLIPEMICOS O ANTIHIPERLIPIDEMICOS.	2
1.3.	CLOFIBRATO.	4
1.3.1.	Efectos del clofibrato sobre el meta- bolismo de los ácidos grasos	5
1.3.2.	Efectos del clofibrato sobre el meta- bolismo de triglicéridos.....	7
1.3.3.	Efectos del clofibrato sobre el meta- bolismo de fosfolípidos.....	9
1.3.4.	Efectos del clofibrato sobre el meta- bolismo del colesterol	10
1.3.5	Efectos del clofibrato sobre el meta- bolismo de lipoproteínas.....	11
1.3.6.	Efectos del clofibrato sobre la oxida- ción mitocondrial.....	13
1.3.7.	Otros efectos del clofibrato	14
1.3.8.	Modos de acción del clofibrato.....	17
1.4.	DESARROLLO Y REPRODUCCION EN INSECTOS	28
1.4.1.	Control endocrino del desarrollo de insectos	30



R. 28044

1.4.2.	Control endocrino de la reproducción	37
1.5.	METABOLISMO LIPIDICO EN INSECTOS	38
1.5.1.	Acidos grasos libres	39
1.5.2.	Trigliceridos	43
1.5.3.	Fosfolípidos	45
1.5.4.	Control hormonal del metabolismo - lipídico	46
1.6.	REGULACION DEL METABOLISMO LIPIDICO A TRA- VES DEL SISTEMA AMPc-PROTEINA-QUINASA.	48
1.6.1.	El sistema AMP cíclico-proteína- - quinasa.....	48
1.6.2.	El sistema AMPc-proteína-quinasa en insectos.....	55
2.	MATERIAL Y METODOS.	
2.1.	MATERIAL BIOLOGICO	61
2.1.1.	Insectos	61
2.1.2.	Ratas	63
2.2.	ANALISIS CUANTITATIVO DE LIPIDOS	64
2.2.1.	Aislamiento de lípidos totales	64
2.2.2.	Cromatografía en capa fina: lípidos neutros y lípidos polares.....	66
2.3.	ANALISIS CUANTITATIVO DE FOSFOLIPIDOS	68
2.3.1.	Análisis de fosfolípidos totales...	68

x533162229

	<u>Página</u>
2.3.2. Análisis de fosfolípidos individuales	69
2.4. ANALISIS CUANTITATIVO DE TRIGLICERIDOS..	70
2.5. ANALISIS CUANTITATIVO DE ACIDOS GRASOS LIBRES	72
2.6. ANALISIS CUANTITATIVO DE COLESTEROL TOTAL	72
2.7. CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO	73
2.7.1. Obtención de esteres metílicos .	73
2.7.2. Análisis	75
2.8. RADIO-CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO	76
2.8.1. Obtención de esteres metílicos .	76
2.8.2. Análisis de esteres metílicos...	76
2.9. TECNICAS RADIOSOTOPICAS	78
2.9.1 Sustratos radiactivos.....	78
2.9.2. Preparación de los homogeneizados.....	79
2.9.3. Preparación de los medios de incubación	79
2.9.4. Medidas de radiactividad por centelleo líquido.....	81
2.10. ENSAYOS RADIOENZIMATICOS	81
2,10.1. Triglicérido -lipasa	81
2.10.2. Acetil-CoA-carboxilasa	83

2.10.3.	Proteína-quinasa	84
2.10.4.	Proteína-ligante	87
2.10.5.	Fosfodiesterasa	88
2.11.	DETERMINACION DE NIVELES DE AMP CICLICO ..	90
2.12.	ANALISIS CUANTITATIVO DE PROTEINAS	93

3. RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1.	EFFECTOS DEL CPIB EN EL DESARROLLO Y LA RE- PRODUCCION DE CERATITIS CAPITATA	
3.1.1.	Variaciones en el peso	
3.1.2.	Efectos del CPIB en la apolisis lar va-pupa	
3.1.3.	Toxicidad relativa	
3.1.4.	Efecto del CPIB en la fecundidad ..	
3.2.	EFFECTOS DEL CPIB EN EL METABOLISMO LIPIDICO DE CERATITIS CAPITATA	
3.2.1.	Efectos sobre ácidos grasos libres.	
3.2.2.	Efectos sobre triglicéridos	
3.2.3.	Efectos sobre fosfolípidos totales.	
3.2.4.	Efectos sobre colesterol total	
3.2.5.	Efectos sobre fosfolípidos indivi- duales	
3.2.6.	Efectos sobre la composición de áci dos grasos.....	
3.2.7.	Efectos del CPIB en la incorpora- ción de acetato-1- ¹⁴ C	
3.2.8.	Efectos del CPIB en la incorpora- ción de glicerol-2 ³ -H	

3.2.9.	Efectos del CPIB en la incorpora- - ción de ortofosfato- ³² P	
3.2.10.	Efectos del CPIB en la incorpora- - ción de ácidos grasos-1- ¹⁴ C	
3.2.11.	Efectos del CPIB en la actividad - de acetil-CoA-carboxilasa	
3.2.12.	Efectos del CPIB en la actividad - de triglicérido-lipasa	
3.3.	EFFECTOS DEL CPIB EN EL SISTEMA AMPc-PROTEINA QUINASA EN EL DESARROLLO DE CERATITIS CAPITA TA	
3.3.1.	Consideraciones previas	
3.3.2.	Efectos del CPIB en el sistema AMPc proteínaquinasa	
3.4.	RESUMEN Y CONCLUSIONES	
4.	BIBLIOGRAFIA	

1.1. INTRODUCCION.

En los últimos años se han realizado progresos sustanciales en el conocimiento del METABOLISMO LIPIDICO y su regulación. Las alteraciones de los niveles de lípidos son de gran importancia y pueden jugar un papel patológico de primer orden.

El CLOFIBRATO se emplea como fármaco en el tratamiento de la aterosclerosis, por su capacidad para reducir los niveles tanto de colesterol como de triglicéridos en el plasma sanguíneo humano. El espectro de acción del clofibrato es amplísimo, y su modo de acción es oscuro y aún por dilucidar.

Los INSECTOS son particularmente vulnerables a la disminución de las reservas lipídicas durante el crecimiento, por lo que la acción hipolipidemiante del clofibrato presenta potencial insectostático (Levinson, 1973).

Hasta ahora la insectostasis no ha sido valorada, pero su potencialidad para el control de las plagas de insectos ha sido señalada por Weidhaas (1973), Smith (1973), Smith et al., (1964). El éxito de la esterilización provocada por la irradiación de insectos machos mediante rayos gamma (Knipling, 1959) ha estimulado el estudio de otros esterilizantes e insectistáticos de carácter químico (Matolin, 1973; Ansari, 1973; Buligiskaya, 1973; Harwalakar et al., 1974; Takahashi et al., 1975; Pallós et al., 1976).

A la vista de la urgente demanda de instrumentos de control de las plagas producidas por algunos insectos, las deficiencias metabólicas producidas por compuestos en concentraciones subletales, pueden significar un medio práctico de conservar el número de generaciones anuales de ciertas plagas de insectos por debajo de un nivel perjudicial, al reducir la densidad de población de la plaga sin erradicarla completamente, manteniendo el equilibrio ecológico.

1.2. AGENTES HIPOLIPEMICOS O ANTIHIPERLIPIDEMICOS.

En la actualidad es bien conocida la conexión existente entre la presencia de elevados niveles de lípidos en la sangre y la ATEROSCLEROSIS (Havel y Kane, 1973). por lo que la búsqueda y estudio de agentes hipolipémicos ha alcanzado un gran interés en los últimos tiempos (cfr. Holmes, 1964; Howe, 1973; Witte, 1975).

Distintos tipos de agentes químicos hipolipémicos pueden agruparse según el proceso bioquímico que interfieren con objeto de reducir los niveles lipídicos, aunque a menudo afectan a más de un sistema enzimático.

(1) Compuestos que inhiben la síntesis endógena del colesterol. Pertenecen a este grupo derivados del colesterol, como por ejemplo, 22-25-diazocolestanol que inhibe el primer paso irreversible de la biosíntesis del colesterol catalizado por la β -hidroxi- β -metil glutaril-CoA-reductasa (Counsell, 1962); análogos del ácido farne-soico, como el ácido 3,7,11-trimetildodecanoico que inhibe

la mevalónico-quinasa (Popjack, 1960); derivados de estrógenos, como por ejemplo, 16,16-difluoroequilenin-metil-éter que inhibe la incorporación de ácido mevalónico- ^{14}C a colesterol (Humber, 1962); derivados del ácido mevalónico, como el ácido 3,5-dihidroxi-3,4,4-trimetilvalérico que inhibe la biosíntesis de colesterol (Hulcher, 1971) - y derivados de ácidos ariloxialcanoicos, de los que el mejor ejemplo es el clofibrato (P-clorofenoxi - isobutirato de etilo) que interfieren la biosíntesis del colesterol (Grundy, 1972).

(2) Compuestos que activan el catabolismo del colesterol. Derivados de la tirosina, por ejemplo, el ester metílico de 3,3'-5,5'-tetrayodotironina que estimula la degradación de la cadena lateral del colesterol favoreciendo el catabolismo y excreción del colesterol (Gries et al., 1972).

(3) Compuestos que disminuyen la producción de triglicéridos. El ácido 2-metil-2((1,2,3,4-tetrahidro-1-naftil)fenoxi)-fenoxi-propiónico o nafenopina, por ejemplo, tiene un efecto prioritario sobre los triglicéridos del suero (Dujovne, 1971), y halofenato (acetato de 1-acetamidoetil(p-clorofenil)(m-trifluorometilfenoxi)) - que disminuye los triglicéridos y el ácido úrico del suero y afecta muy poco, sin embargo, los niveles de colesterol (Jepson, 1972).

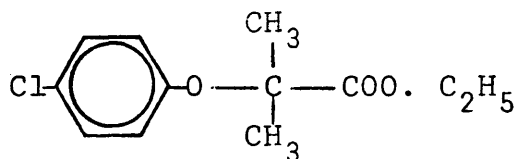
(4) Compuestos que estimulan el metabolismo de triglicéridos. El ácido nicotínico, por ejemplo, se utiliza en clínica con objeto de disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos del suero. Su acción prin-

principal consiste en impedir la movilización de ácidos grasos libres del tejido adiposo reduciendo la disponibilidad de los ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos en el hígado (Carlson y Orö, 1962).

(5) Compuestos que interfieren en la absorción o reabsorción de esteroides o ácidos biliares. Ejemplos de este último grupo son el probucol (4,4'-(isopropilidén-ditio)bis(2,6-di-t-butilfenol)) que impide la absorción y reabsorción de colesterol en el intestino (Polachek, 1972), y resinas secuestrantes de ácidos biliares como la colestiramina que obstaculizan la reabsorción de los ácidos biliares, aumentando su excreción fecal y provocando el incremento del catabolismo del colesterol (Havel y Kane, 1973).

1.3. CLOFIBRATO.

La estructura química del clofibrato corresponde al p-clorofenoxi-isobutírate de etilo.



El CPIB manifiesta marcada actividad en la reducción de los niveles de lípidos totales y colesterol en suero e hígado, combinada con una toxicidad mínima (Thorp, 1962, 1963; Best y Duncan, 1963). El CPIB posee una absorción digestiva en el hombre rápida y uniforme siendo hidrolizado por enzimas séricas a ácido p-clorofe-

noxiisobutírico. En la sangre aparece unido a albúmina y otras proteínas. En su mayor parte se elimina en la orina comoglucurónido. Su vida media en el hombre es de 10-14 horas (Thorp, 1964; Croothamel, 1975; Chasseaud, 1974).

1.3.1. Efectos del CPIB sobre el metabolismo de los ácidos grasos.

El CPIB reduce los niveles de ácidos grasos libres circulantes en el plasma y además disminuye la liberación de los ácidos grasos libres del tejido adiposo a la sangre "in vitro" (Barrett, 1966; Cenedella, 1968). Además, el CPIB inhibe la movilización de lípidos plasmáticos originada por noradrenalina en un 50% (Barrett, 1968). Por otro lado, desplaza los ácidos grasos plasmáticos de la albúmina con lo que la entrada de ácidos grasos en el hígado disminuye (Thorp, 1971).

El CPIB altera, también, la composición de los ácidos grasos plasmáticos, aumentando el contenido relativo de ácido oleico (18:2) (Cenedella, 1968; Maier et al., 1975). En el caso de pacientes con hiperlipoproteína tipos III y IV, tratados con CPIB, Takayasu y Ken (1971) encontraron incremento de ácido nervónico (24:1) en la fracción de fosfolípidos, de ácido linolénico (18:3) en la fracción de esteres de colesterol y de ácido eicosaenoico (20:5) en la de triglicéridos. El ácido linoleico y el ácido araquidónico disminuyen en el hígado de ratas tratadas con CPIB (Kramer y Mihaly, 1975).

Posteriormente, se han venido demostrando los efectos del CPIB en la biosíntesis de ácidos grasos y en la incorporación de distintos isótopos a esta fracción lipídica.

Así, por ejemplo, la droga aumenta la incorporación de acetato $-1-^{14}\text{C}$ "in vivo" a los ácidos grasos hepáticos --- (Sodhi et al., 1971), aunque "in vitro" el CPIB inhibe la síntesis de las diversas clases de lípidos a partir de acetato- $-1-^{14}\text{C}$ y de glucosa- $\text{U}-^{14}\text{C}$ en hígado de rata (Fulton et al., 1972). La adición de glucosa al medio de incubación revierte parcialmente el efecto inhibitor del CPIB sobre la síntesis de lípidos a partir de estos mismos isótopos. Por otro lado, la inhibición de la formación de CO_2 marcado a partir de ácido pirúvico- $-1-^{14}\text{C}$ pudiera ser el resultado del bloqueo de alguna enzima de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos (Greenspan et al., 1974). Quagliarello (1974) y Landriscina et al., (1975) han demostrado que el CPIB inhibe tanto la biosíntesis "de novo" a partir de malonil-CoA como, sobre todo, el sistema de elongación de cadena responsable de la síntesis hepática de ácidos grasos saturados e insaturados de longitud de cadena mayor de 16 átomos de carbono.

Se ha demostrado, asimismo, la actuación del CPIB sobre sistemas enzimáticos de gran importancia en el metabolismo de los ácidos grasos como son la ácido graso-sintetasa y la acetilCoA-carboxilasa. "In vitro", el CPIB inhibe la acetilCoA-carboxilasa del hígado (Maragoudakis et al., 1969). La inhibición es competitiva con respecto al ATP y al bicarbonato. Al mismo tiempo, el

CPIB estimula la actividad de ácido-graso-sintetasa "in vitro". Sin embargo, este efecto no parece tener significación fisiológica ya que se inhibe la formación de malonilCoA.

Las actividades de las ácido-grasoCoA-sintetasas de cadena larga y las carnitín-acetil-transferasas correspondientes se estimulan por el CPIB "in vivo" (Solberg et al., 1972) e "in vitro" (Capuzzi et al., 1974 y 1975; Kahonen, 1976). Daae et al. (1973) han demostrado el aumento de actividad de las enzimas acilantes del glicerol-fosfato en hígado de ratas tras la administración de CPIB en la dieta. Estos últimos autores afirman que la disminución de niveles de ácidos grasos libres del suero, la reducción de la liberación de triglicéridos del hígado y la falta de aumento, correspondiente a esa reducción, de los lípidos hepáticos, supone una evidencia, aunque indirecta, de un incremento de oxidación de los ácidos grasos, y una reducción de la formación de glicéridos.

El CPIB inhibe "in vitro" la actividad de lipoproteína-lipasa en epidídimo de rata (Graffnetter, 1971; Whayne et al., 1973). Sin embargo, en humanos, ya se había encontrado un incremento de esta actividad enzimática en tejido adiposo (Hood et al., 1968).

1.3.2. Efectos del CPIB sobre el metabolismo de triglicéridos.

Una disminución más profunda inducida por el _

CPIB, de los niveles de colesterol (Best y Duncan, 1965) condujo a Berkowitz (1965) a la hipótesis de que la hipocolesterolemia causada por la droga es el resultado de la reducción de los lípidos neutros. Wolfe (1973), por su parte, ha demostrado un aumento significativo en el recambio de triglicéridos plasmáticos.

La cantidad y tipo de grasa, la concentración de sacarosa y la presencia o no de colesterol en la dieta son factores importantes en el efectos hipotrigliceridémico del CPIB. Los triglicéridos disminuyen en ratas alimentadas con dietas saturadas de grasa animal (Grundy, 1972; Ip et al., 1976), pero aumentan en ratas alimentadas con dietas conteniendo aceite de maíz (elevadas concentraciones de ácidos grasos insaturados) (Kokatnur, 1969). No se observa efecto alguno en los triglicéridos cuando en la dieta existe colesterol (Kokatnur, 1969). En ratas alimentadas con dieta de alto contenido de sacarosa el CPIB produce un incremento del recambio de triglicéridos plasmáticos (Biverman, 1970), al tiempo que un aumento de VLDL del plasma (Segal, 1972); en definitiva, una disminución de la concentración sérica de triglicéridos (Ip et al., 1976).

El efecto hipotrigliceridémico del CPIB podría ser el resultado de la inhibición de la síntesis hepática de glicerolípidos. En efecto, Adams et al. (1971) han demostrado "in vitro" la inhibición de la formación de diglicéridos y triglicéridos hepáticos a partir de

sn-glicerol-3-P- ^{14}C . A su vez, Lamb et al. (1971) manifiesta la inhibición de la actividad de la sn-glicerol-3-P-acil-transferasa que cataliza la síntesis "de novo" de glicerolípidos. La capacidad del CPIB para estimular la glicerol-3-P-deshidrogenasa y disminuir los niveles de glicerol-3-P se refleja por distintos autores (Hess et al., 1965; Westerfeld et al., 1968; Azarnoff et al., 1971; Fallon et al., 1972). Ambos efectos del CPIB, inhibición de la síntesis de triglicéridos y aumento de la actividad de la deshidrogenasa del glicerol-3-P, pueden estar relacionados (Fallon et al., 1972; Cenedella et al., 1976).

1.3.3. Efectos del CPIB sobre el metabolismo de fosfolípidos.

Existe una información muy limitada en relación con los cambios en los niveles de fosfolípidos plasmáticos o tisulares efectuados por el CPIB. Galli et al. (1970) han demostrado en ratas a las que se había inducido un síndrome nefrótico por inyección de derivados de puromicina con incremento concomitante de la concentración sérica de fosfolípidos en general, y de lecitinas en especial, que el CPIB revertía completamente este efecto reduciendo los niveles de fosfolípidos. Además, existe un notable aumento en la concentración de fosfatidilcolina en la bilis de perros tras la administración crónica del CPIB (Horning et al., 1972). Independientemente -

del tipo de grasa de la dieta de ratas, se obtuvieron similares disminuciones de fosfolípidos totales del suero, aumentando los del hígado (Saito, 1975).

En humanos el CPIB aumenta la incorporación de glicerol-2-³H a los triglicéridos y fosfolípidos sintetizados en el hígado (Sodhi et al., 1971).

1.3.4. Efectos del CPIB sobre el metabolismo del colesterol.

El CPIB reduce uniformemente la concentración del colesterol plasmático (Thorp, 1962) así como en el hígado y la bilis de ratas (Cohen et al., 1974). Además, el incremento observado en la excreción de esteroides neutros fecales en humanos, inducido por la administración del CPIB en la dieta (Berkowitz, 1964; Grundy et al. 1969, 1972) y de colesterol y ácidos biliares en la bilis de perros (Horning et al., 1972), trae como consecuencia la movilización y pérdida posterior del colesterol endógeno.

Horlick et al. (1971) han sugerido que la inhibición inducida por el CPIB de la biosíntesis de colesterol hepático sería responsable de la caída del colesterol plasmático. Efectivamente, Gans et al. (1971) han demostrado la inhibición inducida por el CPIB de la formación de colesterol a partir de glucosa-1-¹⁴C en hígado de perros. Asimismo, el CPIB inhibe "in vitro" la actividad

de mevalónico-quinasa, enzima que cataliza la conversión de ácido mevalónico a ácido mevalónico-5-P (Walsh et al., 1969; Gamble et al., 1969). También se ha demostrado una disminución inducida por el CPIB de la actividad de β -hidroxi- β -metilglutarilCoA-reductasa en hígado de rata (White et al., 1971; Cohen et al., 1974). Por otro lado, el CPIB estimula "in vitro" la actividad de diversos sistemas enzimáticos implicados en la eliminación de esteroides por el organismo (Einarsson, 1974).

La acción del CPIB sobre el metabolismo del colesterol se revela, sin embargo, conflictiva. Por ejemplo, la presencia o no de colesterol en la dieta produce una considerable variación en los niveles de colesterol del suero en humanos tras la administración del CPIB (Kokatnur, 1969; Berger, 1969). En pacientes con hipercolesterolemia y cirrosis biliar primaria, el CPIB produce una elevación, no una disminución, de los niveles de colesterol (Schaffner, 1969).

1.3.5. Efectos del CPIB sobre el metabolismo de lipoproteínas.

El efecto hipotrigliceridémico de CPIB podría explicarse por la reducción de los niveles de VLDL en el plasma humano o bien por enlace del CPIB al péptido B(apo- β -lipoproteína) en la célula intestinal, limitando la capacidad de las lipoproteínas para transportar triglicéridos (Beaumont et al., 1971), pero los datos de la bibliografía

acerca de los efectos del CPIB sobre el metabolismo de lipoproteínas son conflictivos y, a veces, contradictorios.

El CPIB reduce la síntesis de LDL en pacientes con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia combinadas (Scott y Hurley, 1969). En plasma humano, Sodhi et al. (1971) han demostrado la reducción inducida por el CPIB de los niveles de VLDL. Esta reducción podría deberse a una inhibición de la síntesis hepática de VLDL; sin embargo, en individuos normotrigliceridémicos tratados con CPIB la secreción hepática de VLDL aumenta (Wolfe et al., 1970; Barter et al., 1972).

En sujetos alimentados con una dieta hiperlipidemiante (elevada concentración de sacarosa) a los que se administra CPIB, la concentración de HDL del suero disminuye, pero no se alteran las de LDL y VLDL (Segal et al., 1972).

La lipoproteína-lipasa del suero es inhibida "in vitro" por el CPIB, provocando una acumulación de lipoproteínas (Whayne et al., 1972). También, el CPIB inhibe tanto "in vivo" como "in vitro" las lipoproteína-lipasas de tejido adiposo y de corazón de rata (Craffneter y Geizaerva, 1971). Sin embargo, Cenedella et al. (1972) han demostrado un incremento de la actividad de lipoproteína-lipasa en tejido adiposo y músculo esquelético de rata, sugiriendo, más bien, una disminución de triglicéridos plasmáticos mediante el aumento de su aclaramiento por los tejidos periféricos.

1.3.6. Efectos del CPIB sobre la oxidación mitocondrial.

El CPIB puede actuar como un agente desacoplante del transporte de energía de la mitocondria de hígado de ratón (Katyal, 1972). En experiencias "in vitro" se han observado diferencias de actuación entre la forma salina y la forma ester de la droga. La sal sódica del CPIB inhibe la oxidación mitocondrial del succinato, mientras el ester etílico estimula en el mismo sistema biológico la oxidación del succinato (Fulton et al., 1972). Puede suceder que las dos formas compitan en la oxidación del succinato, comportándose como antagonistas debido a su diferente solubilidad. Sin embargo, ya que el ester etílico de la droga se hidroliza rápidamente como la forma salina "in vivo", las diferencias de actividad de las dos formas en este sistema mitocondrial carecen de una interpretación plausible "in vivo". Por otro lado, el ester etílico del CPIB aumenta 4 veces la proporción $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ mitocondrial (Myazawa et al., 1975).

Los niveles hepáticos de mitocondrias aumentan en un 100% a los 2 o 4 días de la administración de la droga. Durante la multiplicación mitocondrial no ocurre ningún cambio en el tamaño de las partículas o en el contenido específico de DNA o RNA, mientras que durante la regeneración del hígado el DNA disminuye en un 50% y el RNA en un 300% (Gans et al., 1973). Es posible que los niveles de mitocon

drias hepáticas sean controlados por la actividad de sus propias proteasas neutras inhibidas por el CPIB (Gear, 1974).

Cederbaum et al. (1973) han observado que el CPIB inhibe tanto la producción como la utilización de energía procedente de la respiración mitocondrial.

El CPIB actúa, además, sobre la integridad de las membranas mitocondriales estimulando la actividad ATPásica y aumentando la baja permeabilidad de las mitocondrias intactas para el NADH (Cederbaum et al., 1973).

"In vitro", el CPIB disminuye las reservas de piridín-nucleótidos inhibiendo así la respiración mitocondrial de hígado de rata (Mackerer et al., 1974).

El estudio de inhibición de la fosforilación oxidativa realizada por el CPIB revela cooperatividad característica de interacciones alostéricas (Panini, 1974). Representaciones de Hill y de Dixon indican que el compuesto interfiere en dos pasos distintos de la ruta de transporte energético.

1.3.7. Otros efectos del CPIB.

Además de su efecto múltiple en el metabolismo lipídico, el CPIB es capaz de afectar determinados sistemas enzimáticos del metabolismo de hidratos de carbono y del metabolismo de proteínas. Así, por ejemplo, el CPIB incrementa en individuos con hiperlipoproteinemia del tipo II, la glutámico-oxalacético-transaminasa (Craig et al.,

1.972). Spano et al. (1974) han demostrado también la capacidad del CPIB para afectar el metabolismo del trip-tófano, estimulando probablemente la formación de serotonina. Se ha observado, además, incremento de ornitina-descarboxilasa, de S-adenosil-L-metionina-descarboxilasa y de la incorporación de uridina-³H en hígado de rata, aumentando, asimismo, la síntesis de putrescina y espermidina (Russell, 1971).

Lufkin et al. (1974) han investigado en el tejido adiposo de sujetos obesos la supresión de las actividades de enzimas metabolizantes de hidratos de carbono como son la pirúvico-quinasa, fructosa-1,6-difosfatasa-aldolasa, y fosfofructoquinasa. Además el CPIB inhibe el aumento de estas enzimas provocado por la administración de insulina y epinefrina.

A causa de la incidencia del CPIB en el tratamiento de enfermedades vasculares, Mrhova et al. (1971) han estudiado el efecto "in vitro" e "in vivo" de la droga sobre determinadas enzimas vasculares, encontrando un incremento de las actividades de LDH y MDH en la aorta y una disminución de la fosfatasa alcalina, mientras que las actividades de carboxilesterasa y β -glucuronidasa aórticas no son afectadas por el CPIB ni "in vivo" ni "in vitro". En hígado de rata, el CPIB estimula las actividades de LHD y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (Platt et al., 1969) y asimismo incrementa de una manera moderada la citocromo-reductasa dependiente de NADPH,

5310043654

aunque no tiene acción alguna sobre la glucosa-6-fosfatasa ni sobre la citocromo c-reductasa dependiente de NADH.

Recientemente, Powanda et al. (1976) han reflejado el incremento inducido por el CPIB, de la concentración de albúmina y la disminución de haptoglobina y seromucoide del suero de ratas.

La oxidación de metanol y etanol estimulada por el CPIB "in vivo" e "in vitro" (Carter et al., 1973 ; - Hawkins et al., 1974) sugiere una acción del CPIB sobre la catalasa (Krishanakantha et al., 1973; Goldeberg et al., 1976) en el sentido de un incremento de su actividad.

La acción del CPIB como antidiurético ha sido también objeto de investigación con variable éxito. Así, por ejemplo, no se encontró efecto alguno en la diuresis en el caso de ratas con síndrome diabético espontáneo (Dumas et al., 1972), tampoco en el caso de ratas con "diabetes insipidus" hereditaria (Baisset et al., 1973). Sin embargo, se ha demostrado en pacientes con "diabetes insipidus" neurohipofisaria la acción antidiurética del CPIB asociada con disminución del flujo efectivo renal. (Bonnici et al., 1973; Wada et al., 1973; Meinders et al., 1975).

Un nuevo campo de acción de la droga lo constituye la agregación plaquetaria. Efectivamente, el CPIB produce un estado de hipocoagulabilidad con aumento de los tiempos de coagulación y la actividad fibrinolítica, y disminución de la agregación plaquetaria en conejos -

- (a) inducción de hipertiroidismo,
- (b) distribución y concentración de ubiquinona,
- (c) inhibición de la biosíntesis del colesterol,
- (d) inhibición de la biosíntesis de triglicéridos,
- (e) inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos, y
- (f) alteraciones en el sistema de adenil-ciclasa.

(a) Inducción de un hipertiroidismo hepático.

La acción hipolipidémica del clofibrato y sus efectos en el tamaño del hígado (hepatomegalia) pueden estar relacionados con la inducción de un hipertiroidismo hepático. Esta hipótesis se apoya en la desaparición del usual efecto hipolipidémico de CPIB en el caso de animales tiroidectomizados (Best y Duncan, 1964). Además, la actividad de α -glicerofosfato-deshidrogenasa aumenta en las mitocondrias de las ratas tratadas con CPIB, efecto semejante al producido por hipertiroidismo (Westerfeld et al., 1968).

Sin embargo, ciertos efectos del CPIB, como la proliferación de microcuerpos (Azarnoff y Svoboda, 1969) y la prevención de la formación de un hígado graso producido por ácido crótico (Westerfeld et al., 1972) persisten en animales tiroidectomizados. En humanos ningún cambio en la concentración de tiroxina libre se ha encontrado en el plasma de sujetos tratados con CPIB (McKerron et al., 1969). Y no hay, actualmente,

alimentados con una dieta rica en colesterol, y en ancianos arteroscleróticos (Baldoni et al., 1972, 1973; Spreafico et al., 1973; Misker et al., 1976).

Pantaleoni et al. (1974) han descubierto la interacción existente entre el CPIB y la función reproductora al reducir el número de nacimientos procedentes de ratas hembras tratadas con CPIB. Existe también disminución de estrógeno urinario y perturbación del estro. Sólo las hembras son, aparentemente, las responsables de la acción antifertilizante del CPIB. Sin embargo, en humanos, se han descrito varios casos de impotencia masculina a consecuencia del tratamiento con CPIB (Schneider y Kaffarnik, 1975).

Recientemente, se comienzan a investigar los efectos del CPIB en distintos aspectos metabólicos de levaduras; por ejemplo, el CPIB reduce la síntesis lipídica por inhibición de la pirúvico-deshidrogenasa (Greenspan et al., 1973), y también disminuye la incorporación de acetato- $1-^{14}\text{C}$ a lípidos (Pan, 1974).

1.3.8. Modos de acción del CPIB.

A pesar de los numerosos estudios dedicados a la investigación de los efectos del clofibrato, su mecanismo de acción no se comprende aún completamente.

Los modos de acción propuestos por los diversos autores son, en resumen, los siguientes:

- (a) inducción de hipertiroidismo,
- (b) distribución y concentración de ubiquinona,
- (c) inhibición de la biosíntesis del colesterol,
- (d) inhibición de la biosíntesis de triglicéridos,
- (e) inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos, y
- (f) alteraciones en el sistema de adenil-ciclasa.

(a) Inducción de un hipertiroidismo hepático.

La acción hipolipidémica del clofibrato y - sus efectos en el tamaño del hígado (hepatomegalia) - - pueden estar relacionados con la inducción de un hipertiroidismo hepático. Esta hipótesis se apoya en la - desaparición del usual efecto hipolipidémico de CPIB - en el caso de animales tiroidectomizados (Best y Duncan, 1964). Además, la actividad de α -glicerofosfato- -- deshidrogenasa aumenta en las mitocondrias de las ratas tratadas con CPIB, efecto semejante al producido - por hipertiroidismo (Westerfeld et al., 1968).

Sin embargo, ciertos efectos del CPIB, como - la proliferación de microcuerpos (Azarnoff y Svoboda, - 1969) y la prevención de la formación de un hígado graso producido por ácido crótico (Westerfeld et al., 1972) persisten en animales tiroidectomizados. En humanos - ningún cambio en la concentración de tiroxina libre se ha encontrado en el plasma de sujetos tratados con - CPIB (McKerron et al., 1969). Y no hay, actualmente,

evidencia alguna de que la unión del CPIB a las proteínas plasmáticas (Thorp et al., 1968) altere el metabolismo de la tiroxina en el hombre. La tiroxina es capaz de actuar en el metabolismo del colesterol aumentando la velocidad de liberación del mismo, pero este efecto se realiza a partir de acetato, no a partir de mevalonato como es el caso del CPIB (Kritchevsky et al., 1964). Fisher (1967) ha demostrado la diferente actuación sobre tejidos extrahepáticos de la tiroxina y el CPIB con respecto a la liberación de ácidos grasos libres.

(b) Distribución y concentración de ubiquinona.

Las ratas tratadas con ubiquinona, cuya cadena lateral se deriva del ácido mevalónico, presentan una reducción de colesterol en el plasma y una inhibición de la síntesis de colesterol hepático similares a las producidas por el CPIB, por lo que se ha sugerido que la acción hipocolesterolémica del CPIB es el resultado de la acumulación de ubiquinona en el hígado (Krishnaiah y Ramasarma, 1970).

(c) Inhibición de la biosíntesis de colesterol.

Grundy et al. (1965) han destacado la combinación de dos acciones del CPIB en la disminución del colesterol: (1) aumento del flujo de colesterol desde los lugares de almacenamiento al plasma produciendo una disminución del colesterol total del cuerpo, (2) inhibición del aumento

compensatorio que se realiza por medio de la síntesis de colesterol. Lakshamanan et al. (1968) han señalado la posibilidad del bloqueo de la conversión de acetato a mevalonato por el CPIB inhibiendo la biosíntesis de colesterol y la estereidogénesis. Por último, la inhibición de la β -hidroxi β -metil-glutaril-CoA-reductasa del hígado ha sido demostrada por White et al. (1971).

(d) Inhibición de la biosíntesis de triglicéridos.

Se ha sugerido que la acción hipocolesterolemica del CPIB es el resultado de la reducción de triglicéridos. Esta hipótesis se apoya en la mayor disminución efectuada por el CPIB en los niveles de triglicéridos que en los de colesterol y en la observación de que los valores más bajos de colesterol coinciden en aquellos sujetos con valores de triglicéridos más bajos (Berkowitz et al., 1965).

Fallon et al. (1972) han demostrado que la inhibición de la formación de triglicéridos hepáticos es una consecuencia metabólica de la administración de CPIB y precede a la reducción de triglicéridos del suero. Además, el CPIB inhibe la esterificación de sn-glicerol-3P por homogeneizados de hígado de rata y preparaciones microsomales. El paso inicial de esta ruta, acil-CoA-sn-glicerol-3-P-aciltransferasa se inhibe "in vitro" por el CPIB.

Se han insinuado múltiples hipótesis - - - para explicar el mecanismo de acción por el que la droga reduce los triglicéridos del suero. Por ejemplo, la supresión de la síntesis de triglicéridos hepáticos incidiría en la disminución de la liberación de triglicéridos hacia la sangre (Adams et al., 1971). Otra posibilidad consistiría en el aumento de captación por el - tejido adiposo de los triglicéridos provenientes de la sangre (Cenedella et al., 1968). Un incremento del catabolismo de lipoproteínas podría jugar, también, un papel muy importante en la reducción de triglicéridos plasmáticos efectuada por el CPIB (Capuzzi et al., 1974).

(e) Inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos.

El CPIB inhibe la acetilCoA carboxilasa hepática, enzima reguladora de la biosíntesis de ácidos grasos, compitiendo con acetilCoA e isocitrato por el mismo sitio de la enzima (Maragoudakis et al., 1969). La unión de la droga a la proteína enzimática puede causar cambios conformacionales suficientes para distorsionar la estructura de las subunidades e impedir que for- -- men un agregado estable y activo. Sin embargo, esta - inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos hepáticos no terminaría de explicar, por ejemplo, la reducción de la síntesis de triglicéridos ya que la síntesis de li- -- poproteínas disminuye en hígado de ratas tratadas con -

CPIB durante perfusión con altas concentraciones de ácidos grasos de cadena larga (Duncan et al., 1964)

La liberación de lipoproteínas disminuida por el CPIB, podría deberse a la actuación del CPIB sobre algunas enzimas claves en el metabolismo de ácidos grasos distintas de la acetilCoA carboxilasa: acilCoA-sintetasa activadora de ácidos grasos, carnitina-palmitil-aciltransferasa que cataliza el transporte de ácidos grasos activados al interior de la mitocondria donde tiene lugar la β -oxidación, enzimas acilantes del α -glicerofosfato que incorporan los ácidos grasos activados a los glicéridos (Capuzzi et al., 1974).

(f) Alteraciones en la membrana plasmática a través del sistema de adenil-ciclase.

Greene et al. (1970) han descrito una disminución de la actividad de adenil-ciclase por el CPIB. Asimismo, los niveles de AMPc disminuyen por la acción del CPIB (Curtis-Prior, 1974). Esta disminución del AMPc demostrada en la célula adiposa, podría estar asociada con la reducción de actividad de lipasa sensible a hormonas (Hunninghake y Azarnoff, 1968), la actividad de proteína-quinasa y el aumento de actividad de lipoproteína-lipasa (Tolman et al., 1970). Estas investigaciones colocarían la acción primaria y el mecanismo de acción del CPIB en la membrana plasmática del adipocito. El efecto coordinado de esos cambios sería

la inhibición de la lipólisis y la liberación de los triglicéridos unidos a lipoproteínas. La disminución de la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo podría contribuir al efecto hipolipémico de la droga limitando la síntesis hepática de triglicéridos.

Giocoli (1971) ha sugerido que el CPIB podría ejercer sus efectos hipolipidémicos por mediación de la insulina, o al menos ejercer acciones "insulino-miméticas". La insulina ejerce, al menos, parte de sus efectos en el adipocito disminuyendo la concentración de AMPc intracelular, y entre sus acciones más importantes están la estimulación del transporte a través de la membrana de la glucosa y la reducción de AMPc que inhibe la actividad de adenil-ciclasa o estimula la actividad de una fosfodiesterasa, asociada a la membrana, dependiente de AMPc. De este modo, la acción del CPIB se podría realizar uniéndose a la membrana o a receptores citoplasmáticos, bloqueando la unión de diferentes hormonas a estos lugares específicos e impidiendo la acción lipolítica de las hormonas. Sin embargo, el CPIB inhibe "in vitro" la lipólisis inducida tanto por norepinefrina como por ACTH en adipocitos de rata, e inhibe el incremento de AMPc inducido por norepinefrina (Carlson et al., 1973; D'Costa et al., 1973). Estos hechos hacen improbable una interacción, al menos específica, del CPIB con receptores.

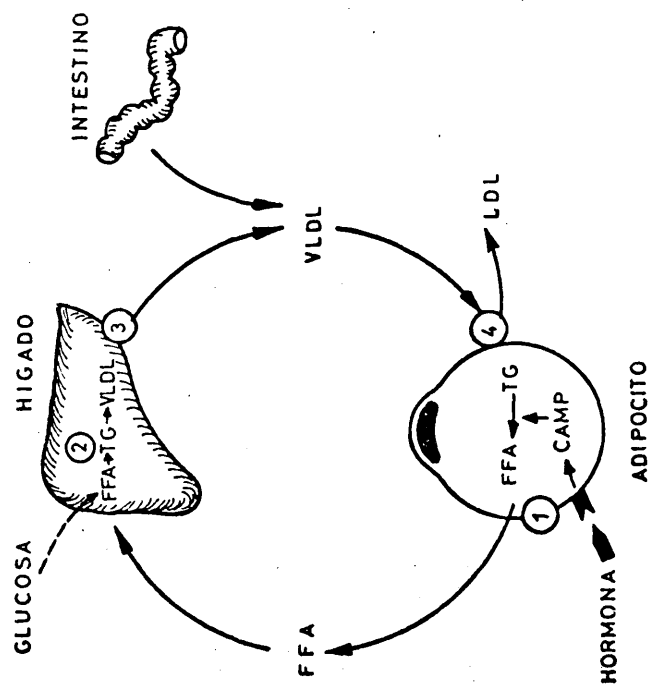
La figura 1 representa el papel de AMPc en el ciclo adiposo hepático de lípidos de diversos lugares de acción del CPIB según D'Costa (1975) que resu-

men la complejidad de datos obtenidos sobre la acción - del CPIB.

El efecto preponderante de la insulina y la - epinefrina en el metabolismo lipídico de la célula adiposa es la regulación de la entrada y salida de triglicéridos. La insulina estimula la lipasa, aumentando - así la entrada de ácidos grasos libres, provenientes - del tejido adiposo, e inhibiendo la lipasa sensible a - hormonas; de este modo, disminuye la liberación de ácidos grasos libres de triglicéridos en el adipocito. La epinefrina actúa principalmente por medio de recepto - res adrenérgicos y la adenil-ciclase, para activar la - lipasa sensible a hormonas, aumentando la liberación de ácidos grasos libres.

La epinefrina seguiría el siguiente proceso: (1) unión a receptores de la célula adiposa que acti - van el sistema de adenil-ciclase produciendo AMPc, éste activa entonces la lipasa sensible a hormonas y aumenta la lipólisis, (2) las enzimas glicolíticas (PFK y PK) - se desactivan, y se activa al mismo tiempo, la FDPasa - - (aunque puede que este efecto no sea de importancia fi - siológica), y (3) inhibición de la acción de la lipopro - teína-lipasa. El resultado sería: disminución de gli - colisis, lipogénesis, hidrólisis de lipoproteínas y - aumento de liberación de ácidos grasos libres por medio de la lipólisis.

La insulina, por otro lado, (1) desactiva la



- ① ADENILATO CICLASA
- ② ESTERIFICACION DE AGL
- ③ SECRECION DE VLDL
- ④ DEGRADACION DE VLDL

Figura 1.→

lipasa sensible a hormonas, (2) activa las enzimas glicolíticas (PFK y PK) y desactiva la FDPasa, y (3) activa la lipoproteína-lipasa. El resultado sería : aumento - de glicolisis, lipogénesis, hidrólisis de lipoproteínas, aumento de la entrada de glucosa y disminución de lipolisis (cfr. Lufkin et al. 1.971).

El CPIB suprime las acciones específicas de la insulina y la epinefrina en enzimas glicolíticas y gluconeogénicas del tejido adiposo (Lufkin et al., 1971), por lo que el CPIB debe actuar sobre la membrana plasmática, lugar de acción común a ambas hormonas.

Teniendo en cuenta únicamente la acción del CPIB sobre el AMPc (Carlson et al., 1972) se podría establecer la siguiente secuencia de efectos: el CPIB disminuye el AMPc en tejido adiposo, reduciendo la lipolisis de triglicéridos, la entrada en el hígado de ácidos grasos libres disminuye por tanto, lo cual implica una síntesis y secreción reducida de VLDL en el hígado y la reducción de niveles de triglicéridos plasmáticos.

Otra hipótesis, sostenida por el mismo autor - supone la íntima relación entre los niveles de AMPc y la actividad de lipoproteína-lipasa del tejido adiposo. Según esta hipótesis los niveles reducidos de AMPc promueven el aumento de actividad de lipoproteína-lipasa - y la disminución de la actividad de triglicérido-lipasa sensible a la hormona (Tolman et al., 1970).

1.4. DESARROLLO Y REPRODUCCION EN INSECTOS.

El desarrollo postembrionario de los insectos, como el de otros animales, implica dos procesos completamente distintos que tienen lugar de forma simultánea: el crecimiento y la diferenciación. El crecimiento se refiere a un aumento en el número o tamaño de las células y está mucho más marcado cíclicamente que en la mayoría de los animales, debido a la existencia de una cutícula rígida que limita de modo efectivo la dimensión lineal del insecto. La diferenciación supone un cambio de forma y una alteración del modelo metabólico; una fase o etapa vital de los insectos se distingue de la siguiente por su tamaño y/o a menudo, por diferencias profundas en los detalles de la organización estructural. El grado en que ocurre tal diferenciación a lo largo de la vida del insecto constituye la base de tres grupos de la clase INSECTA: ametábolos, hemimetábolos y holometábolos.

El díptero *Ceratitis capitata* (Tripetidae), material biológico empleado en el presente trabajo, pertenece al grupo de los HOLOMETABOLOS, es decir, que sufre una metamorfosis completa. Una vez que la embriogénesis ha tenido lugar, y una pequeña larva se ha abierto camino a través del corion, ésta se alimenta en una dieta estándar (apartado 2.1.1.) en el laboratorio, sintetizando una nueva cutícula y desprendiéndose del

viejo exosqueleto (ecdysis). Este fenómeno sucede - - cuatro veces correspondiendo a cinco fases o estadios larvales que se suceden a lo largo de 7-8 días. La larva - más vieja es mayor pero no muy diferente de su predecesora. En el último estadio la larva desarrolla un pupario dentro del cual ocurre la primera muda metamórfica (larva-pupa). El insecto permanece inmóvil a la vez que - - tiene lugar la formación del pupario mediante una serie de cambios que rápidamente transforman la conformación larvaria. A esta etapa de breve duración sigue la fase de farato-adulto, donde tienen lugar una serie de transformaciones bioquímicas y fisiológicas que caracterizan el cambio de las estructuras larvarias en las del adulto mediante procesos histolíticos e histogénicos. En Ceratitis capitata, esta fase dura 7-8 días, luego emerge el adulto que alcanza la madurez sexual hacia el 4°-5° día e inicia la - oviposición el 7°-8° día aproximadamente de su vida adulta, comenzando de nuevo el ciclo.

La reproducción de los insectos es sexual, basada en órganos reproductores adecuados. El control endocrino afecta principalmente al desarrollo de los ovarios que tiene lugar en varios estadios a lo largo de los - - cuales células nutricias (trofocitos) van desapareciendo mientras crece el vitelo ocupando casi toda la célula - huevo. El proceso de la ovogénesis se completa con la - formación de las membranas del huevo, y éste rompe su folículo para entrar en el oviducto donde es fertilizado y

eventualmente depuesto. En el macho, glándulas accesorias producen en cooperación con partes glandulares del tracto genital el fluido seminal y las cápsulas espermáticas especiales (espermátóforos) en que se transfiere el esperma a la hembra. Además de las glándulas accesorias que segregan, en la hembra, diversas sustancias adhesivas que sirven como cubiertas protectoras para el huevo, existen uno o más divertículos (espermatecas) donde se almacena el esperma tras la inseminación.

1.4.1. Control endocrino del desarrollo de insectos.

Aunque existen razones fundadas para no utilizar el término "muda" (Hinton, 1971), la hormona que inicia la apolisis se ha denominado hormona de la muda (ecdisona, - HM). El sistema endocrino que regula la muda y la metamorfosis está compuesto por el cerebro y glándulas asociadas inervadas por el cerebro (corpora allata y corpora cardiaca) y grupos de células lobuladas en la región torácica o glándulas protorácicas. Células neurosecretoras específicas producen una hormona cerebral que entra en los corpora cardiaca, posiblemente allí es modificada y almacenada, y finalmente alcanza la hemolinfa del insecto donde se supone que estimula la síntesis y/o la liberación de la HM de las glándulas protorácicas. Una hipótesis alternativa elaborada por Gilbert (1974) implica la secreción, por las glándulas protorácicas, de una sustancia que se convier

te en la principal HM por las células-blanco. Por su parte, los corpora allata segregan la hormona juvenil (neotenina, HJ) que actúa en coordinación con la HM para determinar si la muda será larva-larva (alta concentración de HJ), larva-pupa (bajo contenido de HJ), o pupa-adulto (no existe secreción de HJ). La HJ es, por tanto, un agente modificador que favorece la síntesis de estructuras larvarias y se opone a la diferenciación del adulto. Las células epidérmicas se activan en el momento en que la HM alcanza una concentración crítica, -entonces tiene lugar la replicación del DNA, se estimula la síntesis de RNA y de proteínas, etc.-, y sintetizan una nueva cutícula cuya naturaleza (larval, pupal, o adulta) depende de la concentración de HJ a la que las células epidérmicas son expuestas. Aunque las células epidérmicas constituyen el blanco directo de la acción hormonal, existen cambios profundos en el metabolismo y la anatomía interna del insecto durante la metamorfosis que pueden ser modificados por las hormonas.

Esta panorámica general del control endocrino del desarrollo postembrionario de insectos es aún en muchos puntos hipotética, especialmente en lo que se refiere a las relaciones entre la hormona cerebral, la HM y la HJ, y existen numerosas excepciones al esquema clásico (figura 2).

Al menos una de las varias neurosecreciones -

del cerebro que controlan distintos procesos fisiológicos de los insectos estimula las glándulas protorácicas, de modo que éstas segregan la sustancia crítica del proceso de la muda. Ishizaki e Ichikawa (1967) han sugerido la estructura de un polipéptido para la hormona cerebral a semejanza de distintas hormonas (neurosecreciones hipofisarias) de vertebrados, pero no se conoce aún con certeza su estructura química. El mecanismo de acción de esta hormona sobre las glándulas protorácicas permanece incierto, aunque se ha presentado la posibilidad de que la hormona cerebral actúe a nivel del sistema de adenil-ciclase ligado a membranas celulares; efectivamente, las glándulas protorácicas exhiben la mayor actividad de adenil-ciclase de todos los tejidos estudiados (cerebro, cuerpo graso, intestino, etc.) (Applebaum y Gilbert, 1972; Vedeckis y Gilbert, 1973).

Las glándulas protorácicas producen una sustancia que posee la naturaleza de un esteroide, la ecdisona (2β - 3β - 14α , 22 -R 25 -pentahidroxi- $\Delta^{7,5}$ -colestén-6-ona (Karlson, 1966). Existe una α -ecdisona y una β -ecdisona. El papel que una y otra hormona efectúan en el desarrollo de los insectos no se conoce aún perfectamente, aunque parece probable la hipótesis de que la α -ecdisona se comporta al modo de prohormona; de cualquier modo, las glándulas protorácicas son capaces de sintetizar únicamente α -ecdisona (Gilbert, 1974) que luego otros tejidos del insecto convierten en β -ecdisona.

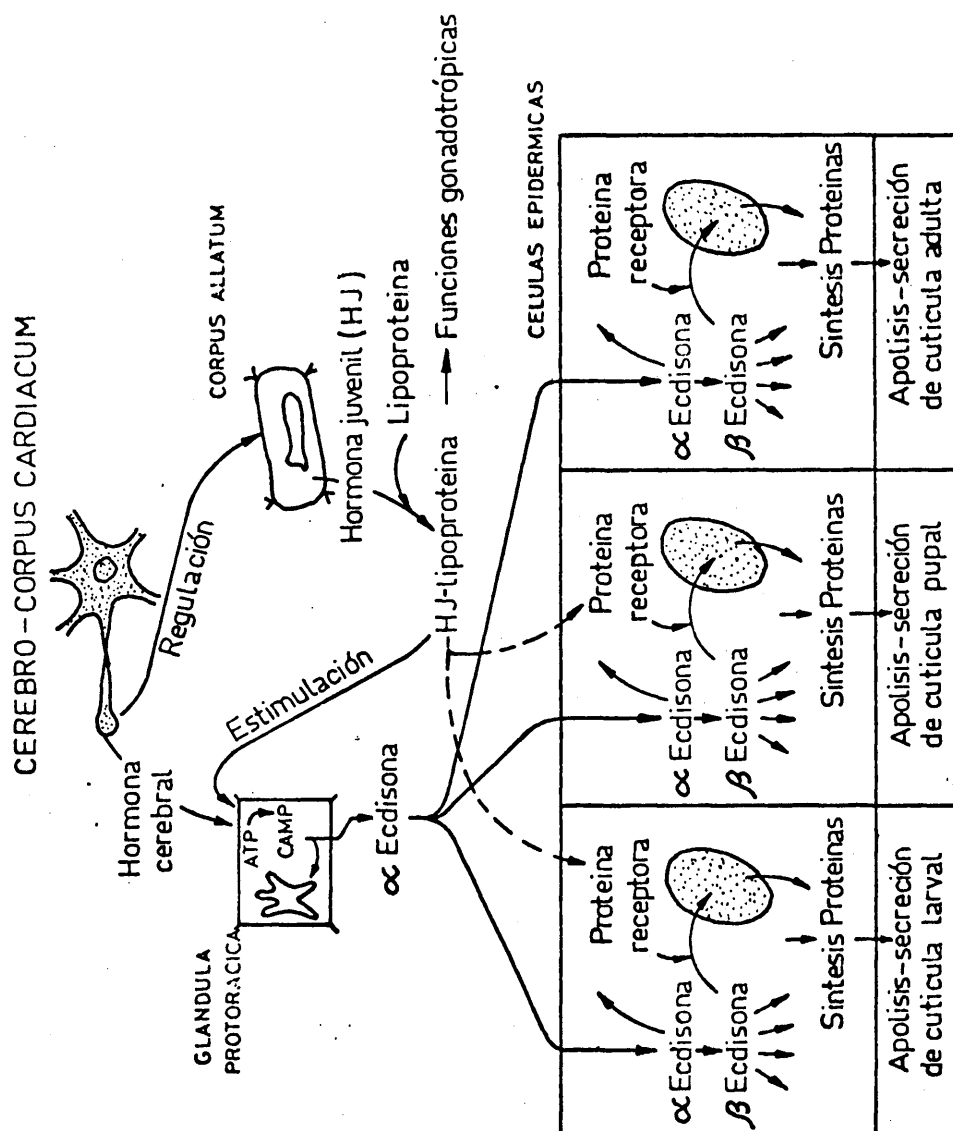


Figura 2.-

La α -ecdisona se produce a partir de colesterol o β -sitosterol. El AMPc parece estimular la secreción de α -ecdisona por las glándulas protorácicas. Otros factores, además, son responsables en parte de la regulación de esta hormona, como la síntesis de RNA, la propia ecdisona y la HJ. El transporte de la α -ecdisona parece realizarse por medio de proteínas de la hemolinfa del insecto. Este tipo de unión facilita la entrada de la hormona en la célula-blanco. Se ha sugerido un papel de los nucleótidos cíclicos en la activación de las glándulas protorácicas que segregan la hormona de la muda. Experimentos tanto "in vivo" como "in vitro" han revelado la estimulación por β -ecdisona de la adenil-ciclase y mediante esta activación, la HM provoca un gran aumento de la síntesis de RNA (Applebaum y Gilbert, 1972).

La función de la HM en el desarrollo del insecto, dando lugar a la iniciación de la apolisis y a la deposición de la vieja cutícula, viene acompañada de una manera específica por la acción de la HJ o neotenina segregada por los corpora allata; es un terpenoide, el ác.trans, trans, cis-10-epoxi-7-etil-3,11-dimetil-2,6-tridecadienoico (Williams, 1956), que parece producirse a partir de ácido mevalónico. La HJ se transporta a través de la hemolinfa por medio de lipoproteínas (HDL, principalmente) (Chino y Gilbert, 1971) que también transportan fosfolípidos, diglicéridos y esteroides (colesterol y β -sitosterol). Ya que la concentración de HJ juega un

papel muy importante en el desarrollo del insecto, debe existir una regulación específica cuya naturaleza aún se desconoce, pero que puede verificarse mediante un mecanismo de retro-inhibición o bien a través de las lipoproteínas de transporte, o bien por medio del antagonismo de la hormona protorácica.

El mecanismo de acción directa de la HM y de la HJ sobre las células epidérmicas no se conoce aún con exactitud; proteínas receptoras, citoplasmáticas y/o nucleares parecen estar implicadas en ambos casos (Gilbert, 1974). El complejo formado se pondría en contacto de algún modo con la cromatina nuclear (para la ecdisona, Emmerich, 1972), aumentando la transcripción o síntesis de mRNA manifestada por un incremento del "puffing" cromosómico (Gilbert y Scheneiderman, 1959).

Las relaciones entre HJ y HM se han explicado para este probable mecanismo de acción según la hipótesis de Jacob y Monod (1965); la HM sería un inductor que combinado con un represor daría lugar a la formación de "puffs", mientras la HJ actuaría como correpresor del gen regulador de la síntesis de proteínas necesarias para la apolisis pupal y adulta.

Un segundo mecanismo hipotético supondría la alteración de la permeabilidad de la membrana por la ecdisona estimulando la bomba de Na^+ mientras la HJ disminuye la proporción K^+/Na^+ (Kroeger, 1963; Lezzi, 1968).

1.4.2. Control endocrino de la reproducción.

La HJ, que desaparece en el estadio pupal del insecto, reinicia su actividad en el adulto maduro sexualmente, en la fecundación y fertilización. La supresión de los ovarios provoca la hipertrofia del corpus allatum, y la privación del corpus allatum impide el desarrollo del ovocito de la hembra. En el macho, la secreción del corpus allatum desempeña un papel importante por lo que se refiere a la actividad de las glándulas accesorias y la formación de los espermatozoides.

En muchos insectos, estado de nutrición y desarrollo de ovarios está íntimamente unido. En ausencia de alimento, el desarrollo del ovocito puede quedar interrumpido; asimismo, la implantación del corpus allatum en insectos hambrientos provoca el comienzo del desarrollo de los ovarios.

La regulación global de la reproducción supone una interacción de factores nerviosos y humorales que implican al cerebro, así como al corpus allatum, los corpora cardiaca y los ovarios (Thomsen, 1952; Harlow, 1956). El corpus allatum activo origina una serie de ondas sucesivas de ovogénesis sugiriendo un tipo de autorregulación por parte de los mismos ovarios.

1.5. METABOLISMO LIPIDICO EN INSECTOS.

Los lípidos constituyen importantes reservas energéticas en los insectos puesto que una cantidad isocalórica de triglicéridos ocupa mucho menos espacio de almacenaje que una cantidad equimolecular de glicógeno, circunstancia de extremo interés en insectos que permanecen volando durante prolongados períodos de tiempo. Por otro lado, muchos insectos tienden a acumular lípidos en estados como la pupación y la diapausa, períodos caracterizados por la falta de alimentación, y también en el momento de la oviposición.

La dieta y precursores no lipídicos como hidratos de carbono y proteínas, tisulares o presentes en la dieta, son las fuentes de donde se derivan los lípidos de los insectos.

Existe una variación muy grande en el contenido lipídico total de insectos de diferentes órdenes e incluso en el interior de una misma familia. Factores como estado de desarrollo, nutrición, temperatura ambiental, sexo, ayuno, diapausa, temperaturas bajas, etc., pueden influir en la concentración de lípidos de un insecto. En general, las hembras contienen más lípidos que los machos, probablemente debido a la relación entre los lípidos de la hembra y el desarrollo del huevo, sin embargo, en muchas familias de Lepidópteros los machos recién emergidos

poseen considerablemente más lípidos que las hembras en -- las mismas condiciones (Gilbert y Schneiderman, 1961).

La mayor parte de los lípidos del insecto se encuentran en el cuerpo graso (Chino y Gilbert, 1965) y la -- composición de los insectos enteros, probablemente, refleja la composición lipídica del cuerpo graso (Cfr. Candy y Kilby, 1974).

1.5.1. Acidos grasos libres.

Los principales ácidos grasos presentes en los lípidos de los insectos son: mirístico (14:0), miristoleico (14:1), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico -- (18:3) (Fast, 1970). La distribución cuantitativa de los -- citados ácidos grasos varía para las diferentes clases de insectos. Como en otras formas de vida, los más abundantes son los ácidos de 16 y 18 átomos de carbono saturados e insaturados. Barlow (1964) ha estudiado en treinta especies diferentes de insectos la composición de ácidos grasos que resulta característica de cada especie. En el caso de los dípteros, los niveles del ácido palmitoleico se encuentran especialmente incrementados.

El díptero *Ceratitis capitata* presenta algunas -- diferencias con el esquema presentado por Barlow para dípteros; las larvas y farato-adultos presentan mayores niveles de ácido palmítico que de palmitoleico, mientras que --

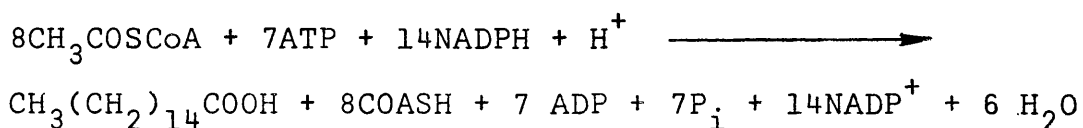
en los adultos la mayor proporción de palmitoleico está directamente correlacionada con la disminución de ácido palmítico (Barroso et al., 1969).

Los ácidos grasos son metabolizados mediante lipasas existentes en el intestino y la hemolinfa (Treherne, 1958; Weintraub y Tietz, 1973; Price, 1974). Los ácidos grasos liberados se incorporan a los lípidos del cuerpo graso donde la existencia de lipasas verdaderas o de esterases permanece una cuestión controvertida (Gilbert, 1967; Chang y Friedman, 1971; Stevenson, 1972; Dutkowsky y Sarzola, 1973). Los ácidos grasos formados durante la acción lipásica son oxidados por las enzimas correspondientes. Se supone que la β -oxidación opera en el cuerpo graso de insectos, pero las actividades de las distintas enzimas implicadas han sido poco estudiadas. Se ha detectado actividad de 3-cetoacilCoA-tiolasa y 3-hidroxiacilCoA-deshidrogenasa, por lo que se supone que el proceso de oxidación ocurre en la mitocondria de insectos como en los sistemas de mamíferos.

Solamente se ha observado una actividad esterásica sobre triglicéridos conteniendo ácidos grasos de cadena corta en *Ceratitis capitata* aunque es difícil delimitar con seguridad la zona fronteriza entre lipasas y esterases (Castillón et al., 1973).

El conocimiento de la biosíntesis de ácidos grasos en los tejidos de insectos, a diferencia de lo que sucede en mamíferos y microorganismos (Wakil, 1961; 1963;

1.966; Lynen, 1967; Vagelos, 1966), es aún fragmentario. la síntesis de ácidos grasos a partir de acetilCoA es llevada a cabo por dos complejos enzimáticos: la acetilCoA-carboxilasa y la acidograso-sintetasa (que contiene la proteína portadora de grupos acilo o ACP) según la siguiente reacción:



Por otra parte, existe un sistema mitocondrial elongador de cadena de los ácidos grasos, aunque su principal ruta de síntesis es la biosíntesis "de novo" que ocurre en el citoplasma de la célula.

Los insectos son capaces de sintetizar ácidos grasos a partir de precursores no lipídicos (Dadd, 1966), y como los mamíferos, son incapaces de sintetizar los ácidos grasos poliinsaturados linoleico (18:2) y linolénico (18:3), requeridos esencialmente en la dieta de la mayoría de los insectos (Dadd, 1973). Estos ácidos grasos deben poseer una función en la permeabilidad de la membrana celular, puesto que tienden preferentemente a incorporarse a los fosfolípidos (Fast, 1966).

La conversión de acetato-1-¹⁴C a ácidos grasos ha sido demostrada en diversas especies de insectos (Sedee, 1961; Chino y Gilbert, 1965, etc.). siendo palmítico (16:0), parmitoleico (16:1), esteárico

(18:0), y oleico (18:1) los principales ácidos grasos - sintetizados.

La síntesis de ácidos grasos saturados e insaturados estudiada "in vivo" a partir de acetato-1- ^{14}C - en larvas de *Calliphora erythrocephala* (Sedee, 1961) parece tener lugar sin interconversión por deshidrogenación; otros autores, sin embargo, han demostrado la existencia de elongación y desaturación de ácidos grasos saturados en insectos (Bade, 1964; Sridhara et al., 1966; Stephen y Gilbert, 1969).

En *Ceratitis capitata*, se ha estudiado la biosíntesis de ácidos grasos tanto "in vivo" como "in vitro" (Municio et al., 1970, 1971, 1972, 1973 y 1974) a partir de acetato-1- ^{14}C y diversos ácidos grasos marcados a lo largo del desarrollo, dando como resultado una mayor incorporación de radiactividad en los homogeneizados pupales y larvales que en los correspondientes a los estadios de huevo y adulto. "In vitro", el acetato 1- ^{14}C se incorpora inicialmente a ácido decanoico (10:0) en la larva, láurico (12:0) y mirístico (14:0) y finalmente a ácidos palmítico (16:0) y palmitoleico (18:1). Los homogeneizados de farato-adulto, por su parte, incorporan acetato marcado a ácidos palmítico y palmitoleico. La radiactividad procedente del acetato-1- ^{14}C se presenta en mayor proporción en los triglicéridos en el caso de homogeneizados larvales, mientras que los homogeneizados de farato-adulto -

incorporan la radiactividad a fosfolípidos mayoritariamente. El estudio "in vitro" de elongación y desaturación de los ácidos grasos larvales da como resultado la conversión de los ácidos decanoico, láurico, mirístico y palmítico marcados con ^{14}C en sus correspondientes derivados moninsaturados y también revelan capacidad de elongación. La desaturación aumenta con la longitud de cadena de los ácidos grasos, pero lo contrario sucede con la elongación. Por su parte, los homogeneizados de farato-adulto son incapaces de elongar o desaturar ácidos grasos.

El tipo de ácido graso sintetizado varía durante el desarrollo y esto debe correlacionarse con alteraciones en enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos.

1.5.2. Triglicéridos.

Los triglicéridos constituyen la fracción principal del contenido lipídico de los insectos en todos los estadios de desarrollo (Fast, 1964). Son absorbidos en el intestino, procedentes de la dieta, y transportados a la hemolinfa y al cuerpo graso; tanto en el intestino, como en la hemolinfa y el cuerpo graso, parecen existir lipasas capaces de hidrolizar triglicéridos a diglicéridos y monoglicéridos. Existe en la hemolinfa una conversión de triglicéridos a diglicéridos en presencia de una lipasa que se supone funcionalmente similar a la lipoproteína-lipasa de mamíferos (Robinson, 1965). El cuerpo graso contiene también

lipasas capaces de hidrolizar diglicéridos (Weintraub y Tietz, 1973) a ácidos grasos libres y glicerol.

El material de reserva existente en el cuerpo graso está formado por triglicéridos sintetizados a partir de glicerol esterificado con ácidos grasos libres. El mecanismo por el que los ácidos grasos son incorporados en los glicéridos de los insectos parece seguir la ruta de Kennedy (1962). Se ha encontrado actividad de glicerofosfato-aciltransferasa en microsomas del cuerpo graso de *Locusta migratoria*, y en la mitocondria una glicerol-quinasa (Tietz, 1967) que cataliza la siguiente reacción:



En *Ceratitis capitata*, la incorporación de ácidos grasos a los triglicéridos constituye un hecho de gran alcance en el metabolismo lipídico. Los homogeneizados larvales incorporan con gran eficiencia ácidos grasos saturados e insaturados, mientras los de farato-adulto son incapaces de ello. (Municio et al., 1975a). Esta diferencia no se debe a variaciones en la actividad acil-CoA sintetasa, sino más bien a la existencia de diferentes niveles de actividad acil-transferasa a lo largo del desarrollo del insecto, capaz de incorporar estereo-específicamente ácidos grasos de modo diferente en cuanto a la distribución y a la eficiencia de incorporación (Municio et al., 1975b).

1.5.3. Fosfolípidos.

Después de los triglicéridos los fosfolípidos son los lípidos más abundantes del cuerpo graso (Beenackers y Gilbert, 1968). La composición de fosfolípidos en insectos ha sido estudiada por Fast (1966) en seis diferentes órdenes manifestando una proporción de fosfatidilcolina a fosfatidiletanolamina menor de 0.7. Algunos datos en las variaciones de fosfolípidos durante el desarrollo de diferentes especies de insectos han sido obtenidos (Sridhara y Bhat, 1965; D'Acosta y Birt, 1966). Casti-llón et al. (1970) han observado la evolución de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, sus lisoderivados y fosfatidilserina a lo largo del desarrollo de *Ceratitis capitata*, concluyendo en la necesidad de enzimas transacilantes responsables de los cambios paralelos en las proporciones de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina con sus plasmalógenos correspondientes.

En un estudio del contenido de fosfolípidos durante el desarrollo de *Bombyx mori*, Niemierko et al. (1956) han demostrado que los niveles de fosfolípidos alcanzan un máximo al llegar al fin de la metamorfosis. Estos investigadores postulan una síntesis de fosfolípidos hacia los últimos días del desarrollo del farato-adulto. Utilizando ortofosfato-³²P, Chojnacky y Korzybski (1962 y 1963) demostraron una mayor incorporación a PE que a PC en los adultos de *Celerio euphorbiae*, sugiriendo un intercambio

de PC con PE. Crone y Bridges (1963) han demostrado -
 "in vivo" una mayor actividad específica de ortofosfato--
 -³²P en fosfatidilcolina que en fosfatidiletanolamina.
 Por otra parte, la incorporación a fosfolípidos es mayor
 en el cuerpo graso de adultos de *Hyalophora cecropia* que
 en el cuerpo graso de pupas en diapausa (Thomas y Gilbert,
 1967).

En adultos de *Ceratitis capitata*, Castellón et -
 al. (1971) han estudiado la incorporación de ortofosfato- -
 -³²P en los fosfolípidos, sugiriendo la existencia de un -
 transporte de fosfátidos entre serina y colina, como se -
 describe para etanolamina y serina en *Musca domestica* y -
Tribolium confusum (Crone, 1967; Beaudoin et al., 1968).

A partir de L-metil-¹⁴C-metionina, Jimenez et -
 al. (1975) han demostrado tanto "in vivo" como "in vitro"
 en *Ceratitis capitata* la existencia de reacciones de meti-
 lación en la actividad metabolizante de distintas clases
 de fosfolípidos, siendo la capacidad del farato-adulto ma-
 yor que la de la larva para incorporar los grupos metilo -
 marcados principalmente a PE.

1.5.4. Control hormonal del metabolismo lipídico.

Parece fuera de duda la existencia de un mecanis-
 mo regulador del contenido lipídico de insectos a cargo -
 del complejo endocrino formado por el corpus cardiacum -
 y corpus allatum. En *Hyalophora cecropia* existe una co- -

rrespondencia entre el contenido lipídico y la concentración de HJ que es mayor en los machos (Gilbert y Schneiderman, 1961). En *Periplaneta americana*, la alatectomía produce, concretamente un incremento de triglicéridos (Vroman et al., 1965); además, la actividad específica de triglicéridos y fosfolípidos es más baja en los insectos alatectomizados tras la inyección de acetato- $1-^{14}\text{C}$. En *Dytiscus*, también se ha observado un aumento de tamaño considerable del cuerpo graso tras la ablación de los corpora allata (Joly, 1968). Durante el desarrollo de *Schistocerca gregaria* la pérdida del corpus allatum no afecta al metabolismo lipídico del cuerpo graso, ni a la incorporación de acetato marcado a lípidos, pero aumenta la conversión de glucosa a lípidos (Walker, 1971). Un homólogo de la HJ actúa como un exceso de hormona provocando la pérdida de casi la mitad de los lípidos en hembras de *Malacosoma pluviale* (Wellington, 1967). También el cerebro de insectos, a través de células neurosecretoras del cerebro, puede estimular la síntesis de triglicéridos en *Aedes aegypti* (Van Handel y Lea, 1970).

La acumulación de lípidos que sigue a la alatectomía no es probable que sea originada por una disminución en la capacidad oxidativa de ácidos grasos del insecto, ni tampoco por una inhibición de la liberación de lípidos, sino más bien a causa de un aumento de la actividad biosintética del cuerpo graso. Gilbert (1967) observa una supresión del 30% en la lipogénesis del cuer

graso de *Leucophaea maderae* al añadir al medio de incubación hormona juvenil. Es posible que la HJ afecte a la ATP-citrato-liasa, enzima clave de la lipogénesis (Hill, 1972). Por otro lado, Bhakthan (1971) sugiere la existencia de cierto tipo de catecolaminas - que liberadas por el corpus cardiacum estimulan la movilización de las reservas lipídicas del cuerpo graso de *Leucophaea maderae* y *Hyalophora cecropia*. Los trabajos de Beenackers (1969) postulan la secreción por el corpus cardiacum de una hormona adipocinética. Este principio activo u hormona adipocinética parece -- ser de naturaleza peptídica y estimularía la acción lipásica del cuerpo graso del insecto. La inyección de extractos de corpora cardiaca en adultos de *Schistocerca gregaria* produce, según este mismo autor, un aumento en la concentración de lípidos de la hemolinfa, al tiempo que aumenta la liberación de diglicéridos en el medio de incubación. (cfr. Spencer et al., 1976).

1.6. REGULACION DEL METABOLISMO LIPIDICO A TRAVES DEL SISTEMA AMPc-PROTEINA-QUINASA:.

1.6.1. El sistema AMPc-proteína-quinasa.

El metabolismo lipídico posee una compleja - regulación de tipo hormonal, nerviosa y enzimática, - además de una subordinación estrecha a las condi- - -

ciones nutricionales y a la introducción de factores exógenos.

Nos interesa destacar el control que se ejerce en el metabolismo lipídico a través de dos enzimas claves, la acetilCoA-carboxilasa y la triglicérido-lipasa, antes de entrar de lleno en la discusión del papel de los nucleótidos cíclicos en este control.

La reacción catalizada por la acetilCoA-carboxilasa se considera, generalmente, como el paso limitante de la velocidad de la biosíntesis "de novo" de los ácidos grasos. Es una enzima alostérica cuya forma protomérica inactiva se transforma en la forma polimérica activa (Gregolin, 1966). La actividad de la enzima viene disminuida por los factores que facilitan la disgregación del polímero: pH alcalinos, presencia de bajos niveles de proteína, presencia simultánea de ATP y Mg^{++} , presencia de NaCl; los ácidos grasos libres, al menos "in vitro", inhiben la actividad de la enzima. Por otro lado, activan la enzima un pH neutro, concentración elevada de proteínas, iones como malonato y citrato que al facilitar la agregación activan la enzima, etc. aunque tal vez algunos de estos efectos no tengan significación fisiológica. Los derivados de CoA: acetilCoA, acilCoA favorecen también la agregación protegiendo de la acción de la avidina que captura la biotina, coenzima de la acetilCoA-carboxilasa. La asociación con las membranas mitocondriales y microsomales favorece la agregación enzimática, ya que

los fosfolípidos del retículo endoplástico estimulan la acetil CoA-carboxilasa (Foster y Whorter, 1969).

Todo estado que implica una movilización de triglicéridos -ayuno, diabetes, dietas ricas en grasa, etc.- produce un movimiento de ácidos grasos libres que influye de manera negativa en la actividad de esta enzima.

En el metabolismo lipídico son reacciones claves la biosíntesis de triglicéridos (lipogénesis) y su hidrólisis (lipólisis), funciones que en mamíferos están localizadas en el tejido adiposo principalmente. El paso limitante de la velocidad de la lipólisis es catalizada por una lipasa denominada "lipasa-sensible-a-hormonas" (Vaughan, 1964; Steinberg, 1967; Schwartz, 1971; Chmelarova, 1974). Otras lipasas existen en el tejido adiposo cuya actividad es muy elevada sobre mono y diglicéridos, aunque puede discutirse su descripción como lipasas o más bien como "esterasas". En el hígado, existen, también varios tipos de lipasas (Pykalisto et al., 1974; Colbeau, 1974; Desnuelle, 1972; Ledford y Alaupovic, 1975).

El factor clave de la regulación de la lipólisis es el 3',5'-AMP (AMP cíclico); este compuesto canaliza el mensaje hormonal hacia la lipasa propia del tejido. Las hormonas actúan sobre la adenil-ciclase que a su vez cataliza la síntesis de AMPc. La fosfodiesterasa degrada el AMPc indirectamente reduciendo la actividad lipolítica (Huttunen, 1971; Robinson, Butcher y Sutherland, 1971). Las membranas aisladas de adipocitos poseen un sistema de adenil-ciclase que es activado, al menos, por seis hormo--

nas: ACTH, glucagón, secretina, LH, TSH y catecolaminas (Bar, 1969; Rodbell, 1970). La especificidad de acción debe estar determinada por la estructura molecular de la hormona y la parte del sistema de adenil-ciclase con la que la hormona interacciona, así como por la naturaleza de la interacción. La comparación de los acontecimientos que ocurren en la acción hormonal a nivel de la membrana plasmática con un sistema de transporte de información con sus canales de selección y amplificación, según Rodbell (1970), ofrecen una explicación intuitiva del fenómeno. Esta hipótesis comprende un modelo operacional con tres componentes: un discriminador que selecciona las señales de entrada; en él residirían la especificidad de las hormonas por las células-blancas. El segundo componente es un transductor que transforma las señales procedentes del discriminador de modo que el tercer y último componente, el amplificador, reconoce estas señales como instrucciones para acelerar su función catalítica. El sustrato activo para el amplificador, o subunidad catalítica, es Mg^{++} -ATP. El NaF activa la enzima de todas las especies estudiadas a excepción de ciertas bacterias.

La fosfolipasa A o la digitonina ocasionan en las membranas plasmáticas de hígado de rata una inhibición de la actividad, dependiente de hormonas, de la adenil-ciclase; este efecto se invierte por incubación con lípidos, y en particular, con fosfolípidos que parecen -

jugar un papel importante en la función del transductor (Rodbell, 1968; Levey, 1973).

El AMPc es un inhibidor alostérico de la fosfo diesterasa. La unión del AMPc a un primer sitio de alta afinidad de la enzima induce un cambio conformacional que conduce a un descenso en la afinidad de un segundo sitio por el AMPc (Robison et al 1971). Este mecanismo es esencial para que los niveles de AMPc no vuelvan al valor basal demasiado rápidamente y ejerzan su activación sobre las proteína-quinasas de la célula. Hasta hace poco tiempo, no se conocía el mecanismo de acción por el que el AMPc ejercía toda la variedad de sus funciones en orden a la regulación del metabolismo y la fisiología celulares, y sólo parámetros secundarios como la estereoidogénesis o la lipólisis indicaban de modo oscuro su modo de acción. En la actualidad existen abundantes hechos que conducen a la dilucidación del mecanismo de acción del AMPc (Walsh y Krebs, 1968; Huttunen et al., 1970; Rubin et al., 1972; Langan, 1973).

Kuo y Greengard (1969) afirman que la mayoría sino todas las acciones del AMPc como segundo mensajero en la transmisión de las señales hormonales, se verifican a través de la activación de las proteína-quinasas.

El AMPc interacciona alostéricamente con las proteína-quinasas, que a su vez pasan de una forma inactiva a una forma activa, catalizando entonces la transferencia del resto fosfato en posición gamma del ATP a -

los residuos de Ser, y con menor frecuencia a los de Treo de la proteína sustrato. La enzima parece estar constituida por dos subunidades, una reguladora y otra catalítica que se disocian en presencia de AMPc (Reiman et al., - 1971).



El equilibrio se desplaza hacia la formación de la proteína-quinasa en su estado activo C por una elevación de los niveles intracelulares de AMPc mediada por alguna hormona. Este mecanismo explica los efectos de muchas hormonas. Por ejemplo, en el caso de la epinefrina y el glucagón que regulan el metabolismo del glucógeno a través de la glucógeno-fosforilasa b-quinasa que es fosforilada por la proteína-quinasa activada como consecuencia del aumento de AMPc efectuado por las hormonas. Esta modificación covalente va acompañada de una activación de esta enzima, que a su vez, fosforila la glucógeno-fosforilasa b, transformándola en fosforilasa a activa, que cataliza el paso de glucógeno a glucosa-1-P. La misma proteína-quinasa fosforila la glucógeno-sintetasa I, inactivándola (Bronstrom et al., 1970) por conversión en su forma D.

De la misma forma, la modificación covalente de la triglicérido-lipasa catalizada por una proteína-quinasa concomitante con una activación de la misma, explica la acción de las hormonas lipolíticas en tejido adiposo, múscu

lo e hígado (Huttunen et al., 1970; Corbin y Krebs, 1970). Si la proteína quinasa directamente fosforila la lipasa en analogía con el sistema de la glucógeno-sintetasa, o bien fosforila y activa una enzima intermedia son hechos no del todo aclarados. El hecho de que la lipasa parezca representar una molécula lipoproteica de gran tamaño, tipo complejo multienzimático, conduce a pensar en la posibilidad de la existencia de pasos enzimáticos adicionales en la activación de la misma. La hipofisectomía que reduce la respuesta del tejido adiposo a hormonas que estimulan la lipólisis pero que no afecta la acumulación de AMPc inducida por epinefrina en el tejido adiposo parece afectar más bien a la proteína-quinasa que disminuye en presencia o ausencia de AMPc, provocando la disminución de la activación inducida por AMPc de la lipasa (Gorin, 1973).

Carlson y Kihankin (1972) han demostrado, a su vez, la regulación de la acetilCoA-carboxilasa por reacciones de fosforilación-defosforilación.

1.6.2. El sistema AMPc proteína-quinasa en insectos.

Durante el periodo larval, tanto la hormona juvenil como la hormona de la muda son segregadas a fin de iniciar la apolisis larval. La transformación a pupa, en los dípteros, ocurre cuando los niveles de HJ son suficientemente bajos. Este fenómeno hace suponer que el incremento de la actividad de la adenil-ciclasa observado es uno de los hechos metabólicos subsiguientes a la acción de HM, así como lo es la síntesis de proteínas. En *Hyalophora gloveri* también se estimula la enzima tras la inyección de ~~A~~ecdisona (Applebaum, 1972). La inyección de ecdisona estimula la adenil-ciclasa en los cerebros de *Manduca sexta*, siendo la glándula protorácica el órgano que exhibe la más elevada producción de AMPc (Verdeckis, 1973). Todos estos datos hablan en favor de la existencia en insectos de un sistema de regulación hormonal análogo al descrito en mamíferos por Sutherland (1960 y 1971).

La actividad de la adenil-ciclasa en *Ceratitis capitata* muestra una pequeña disminución en los primeros días del desarrollo larvaria, para aumentar después y alcanzar un máximo en la apolisis durante el estadio de pupa, permanece constante hasta el quinto día, experimentando un pronunciado aumento en los últimos días del período de pupa. Esta elevación tiene lugar en la etapa del desarrollo del adulto, y debe interpretarse en rela-

ción con el control hormonal del desarrollo del insecto (Castillón et al., 1975). Este sería uno de los casos descritos de una hormona de naturaleza esteroídica que actúa a nivel de la membrana celular, estimulando la adenil-ciclasa para transformar el ATP en AMPc.

El incremento de la actividad de adenil-ciclasa que acompaña al aumento en la secreción de hormona de la muda, no implica necesariamente una elevación simultánea en los niveles de AMPc que están influidos también por la actividad de la correspondiente fosfodiesterasa. La medición en los tejidos de *Ceratitis capitata* de los niveles de AMPc, dió como resultado valores que corresponden con los observados por Kuo (1972) en cuerpo graso del gusano de seda. La concentración del nucleótido aumenta inmediatamente antes de la apolisis de *Ceratitis capitata*, y disminuye durante el estadio de pupa (Catalán et al., 1975). Es muy posible que estos niveles, muy bajos, de AMPc durante el estadio de farato-adulto se deban a una alta actividad de fosfodiesterasa. El aumento tan notable del nucleótido antes de la apolisis, coincide plenamente con los elevados niveles de β -ecdisona detectados en varios insectos en este período del desarrollo.

La actividad de la AMPc-fosfodiesterasa de *Ceratitis capitata* aumenta muy notablemente en la segunda y tercera fase del estadio de larva, mientras los valores obtenidos en el farato-adulto son muy bajos (Cata--

lán et al., 1975). Estos resultados coinciden, en general, con los de Morishima (1973) en *Bombyx mori*. No parece existir ninguna correlación entre la hormona de la muda y la actividad de la fosfodiesterasa, pero existe la posibilidad de que el máximo en la actividad de fosfodiesterasa, que tiene lugar durante las mudas larvales, esté relacionado con la HJ tal como indican Whitmore et al. (1973) en intestino medio de *Manduca sexta*. Estos autores relacionan, asimismo, la inhibición de la fosfodiesterasa con el aumento de hormona de la muda al final de cada estadio. Los niveles máximos de AMPc coinciden con el aumento en la relación de las actividades enzimáticas durante el desarrollo larval, para disminuir rápidamente en el estadio farato-adulto. En el estadio de farato-adulto no se observa correlación entre niveles de AMPc y la relación adenil-ciclasa-fosfodiesterasa, hecho que puede explicarse teniendo en cuenta los datos acerca de la regulación de proteína-quinasa por distintas concentraciones de AMPc, y la especificidad de la fosfodiesterasa por los nucleótidos cíclicos.

Concentraciones crecientes de AMPc producen la activación de proteína-quinasa de la larva, mientras que la actividad de proteína-quinasa se reduce en el caso del adulto recién emergido a altas concentraciones de AMPc. Estos hechos parecen indicar una pérdida progresiva a lo largo del desarrollo del insecto de la capacidad reguladora del AMPc sobre la actividad quinásica, aunque

se observa, al mismo tiempo, un aumento en la actividad de proteína-quinasas dependientes de niveles endógenos de AMPc. Es posible que este hecho se deba a la dependencia de la actividad de proteína-quinasas de un nucleotido cíclico distinto del AMPc. La actividad de proteína-quinasa aumenta el final del desarrollo de larva, y disminuye rápidamente al comienzo del estadio de farato-adulto. La función del cerebro, a través de la hormona cerebral durante el desarrollo de *Ceratitis capitata*, puede ser la responsable del aumento de actividad de proteína-quinasa que, a su vez, regularía la síntesis de la hormona de la muda.

Solamente la actividad de proteína-quinasa perteneciente al estadio larval se estimula normalmente por niveles crecientes de AMPc, mientras las actividades de otros estadios del desarrollo exhiben una desaparición progresiva de la dependencia de AMPc (Catalán et al., 1975).

La actividad de guanil-ciclasa presenta los niveles más altos de actividad en la larva para decaer luego hasta el momento de la emergencia del adulto donde de nuevo aumenta su actividad (Catalán et al., 1976). Es de destacar que en la apolisis larva-pupa, los niveles de las actividades de adenil y de guanil-ciclasa cambian de un modo antagónico, mientras que en la emergencia del adulto aumentan al mismo tiempo. Estos resultados confirman la hipótesis de diferentes esquemas de

regulación ocasionados a partir de AMPc y GMPc. Los cambios en la actividad de adenil-ciclasa durante el desarrollo de *Ceratitis capitata* están de acuerdo con los cambios en la actividad de proteína-quinasa en idénticos estadios del insecto. Sin embargo, la regulación de la actividad de proteína-quinasa por incremento de la concentración de AMPc exógeno exhibe diferente comportamiento según el estadio de desarrollo del insecto y solamente la larva es capaz de ser estimulada por el incremento de AMPc. La desaparición gradual de la capacidad reguladora del AMPc sobre la actividad quinásica después de la metamorfosis puede estar relacionada con la pérdida progresiva de sincronismo en el desarrollo.

Estos hechos introducen la posibilidad de que ciertas funciones celulares tales como el desarrollo larval y la formación del pupario sean controladas de una manera mientras otras como el desarrollo del adulto sean reguladas desde distintos lugares.

2.1. MATERIALES BIOLÓGICOS.

2.1.1. Insectos.

En los diversos experimentos realizados se utilizó el díptero *Ceratitis capitata* en sus diferentes estadios de desarrollo (larva, farato-adulto y adulto).

El desarrollo de *Ceratitis capitata*, vulgarmente denominado "mosca de la fruta" o "mosca del Mediterráneo", puede esquematizarse del siguiente modo (figura 3):

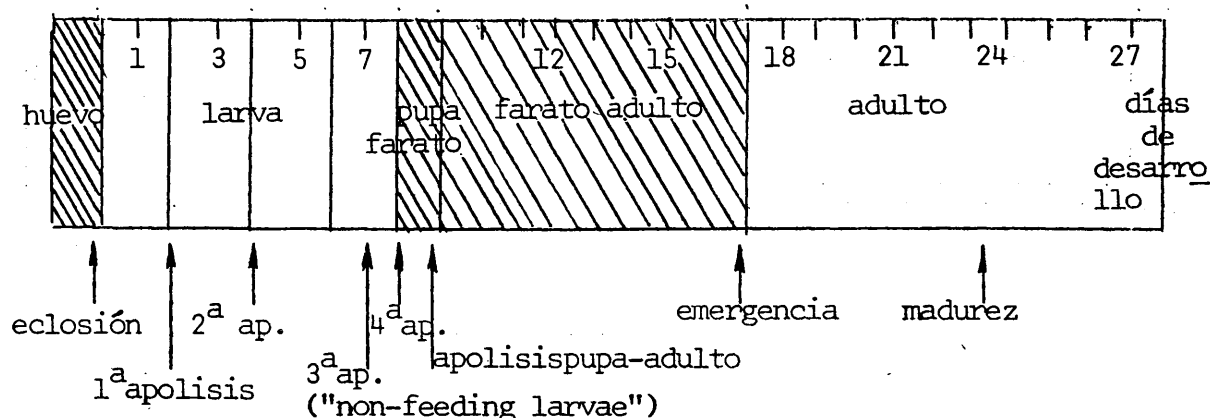


Figura 3

La apolisis designa la separación de las células epidérmicas de la antigua cutícula, mientras la ecdisis determina la formación de la nueva cutícula. Siempre la apolisis precede a la ecdisis (Hinton, 1971).

En el presente trabajo se han utilizado larvas de 4 días, las cuales se desarrollaron en un medio de cultivo de la siguiente composición:

Salvado	450 g
Levadura de cerveza	15 g
Suero de leche	50 g

Sacarosa	150 g
Levadura de pan	6 g
Nipagin	1 g
Nipasol	1 g
HCl 1%	10 ml
H ₂ O	550 ml

El suero de leche contenía:

Proteína	15%
Lactosa	71%
Grasa	1%
Sales	10%
H ₂ O	3%

En las experiencias en las que se ensayó la droga CPIB, el compuesto se mezcló cuidadosamente con la dieta antes mencionada en la proporción deseada, utilizándose para ello un mortero de porcelana.

Las condiciones del cultivo fueron: temperatura, 27°C y humedad relativa, 70%. Durante el experimento se cuidaron las condiciones de intensidad de luz y aireación (Steiner, 1966). Se utilizaron recipientes de plástico con malla de acero inoxidable para permitir una perfecta aireación. El muestreo de larvas, farato--adultos y adultos se realizó al azar, escogiendo siempre el mismo número de individuos por muestra. La determinación de los parámetros biométricos, así como el recuento de individuos y de huevos se realizaron mediante una lupa micrométrica.

Una vez alcanzada la apolisis larva-pupa, se escogie

ron los individuos farato-pupas, que una vez separados de la dieta se lavaron y se secaron posteriormente sobre - papel de filtro. La edad de los individuos farato-adultos se ha considerado teniendo en cuenta como fecha de - partida el día que comienza la apolisis del control y la fecha en que se alcanzó el 90% de pupación en cada muestra.

Los adultos se desarrollaron en recipientes de - plástico conteniendo 200 individuos cada uno.

La dieta de adultos, ausente de droga, estuvo - compuesta por:

Sacarosa 400 g

Hidrolizado de proteínas

(Nutrition Biochemical Corpora-

tion, U.S.A.)..... 100 g

La separación de machos y hembras se realizó mediante criterios anatómicos y 50 individuos de cada sexo fueron colocados en recipientes de plástico especialmente diseñados para permitir la oviposición y recogida poste- - rior de los huevos en placas Petri durante diecisiete días.

2.1.2. Ratas.

Las ratas machos Wistar (150 g) se alimenta- ron con una dieta estandar de laboratorio, y diariamente, durante dos semanas, se les administró CPIB al 0.3% median- te cánula estomacal. El grupo de ratas control se mantuvo en idénticas condiciones excepto la administración de CPIB. Los animales fueron sacrificados mediante decapitación y -

las muestras de hígado y tejido adiposo fueron inmediatamente utilizadas.

2.2. ANALISIS CUANTITATIVO DE LIPIDOS.

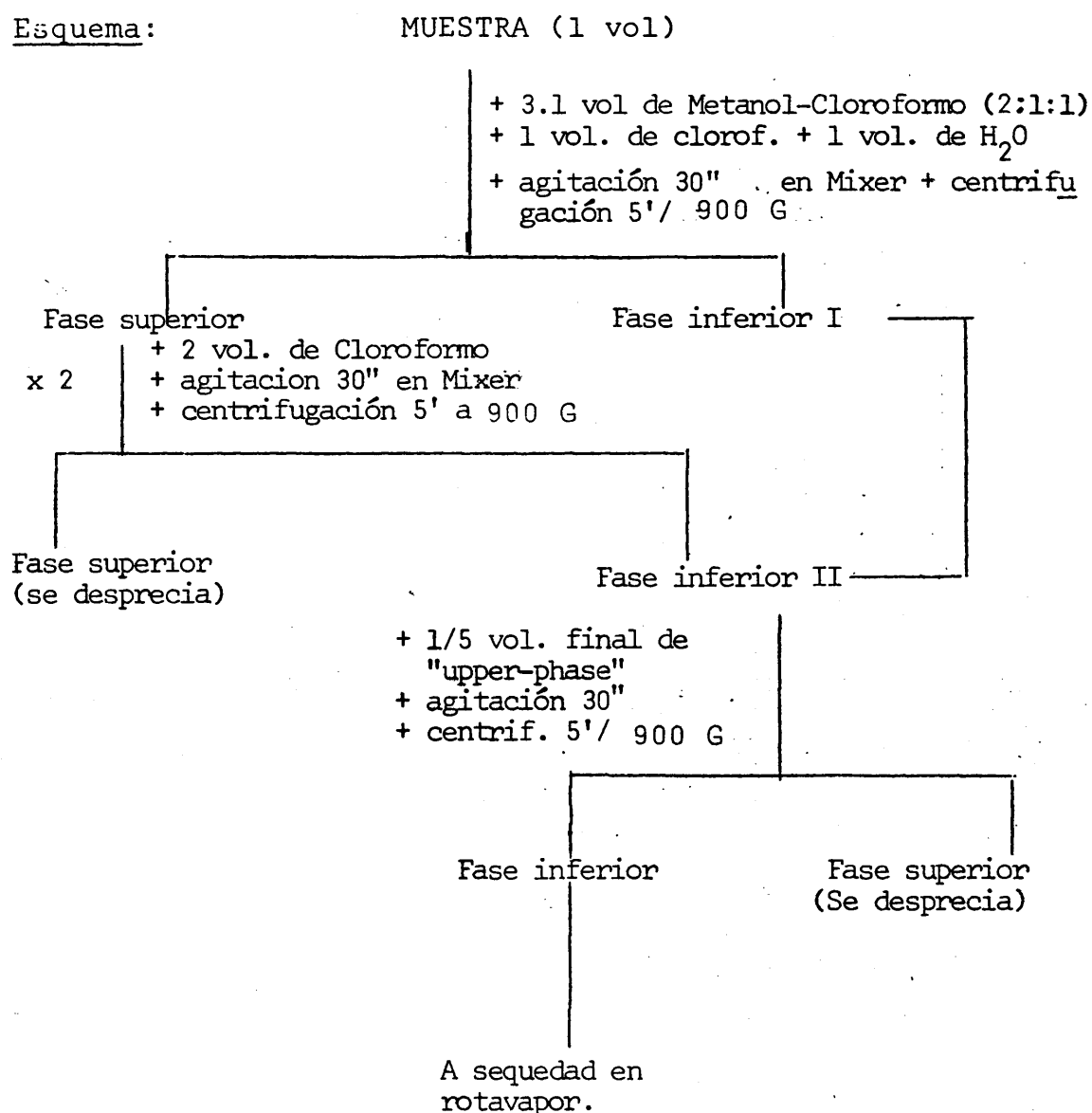
2.2.1. Aislamiento de lípidos totales.

El aislamiento de lípidos totales se llevó a cabo según el método descrito por Bligh y Dyer (1959).

Salvo en los casos en que se especifique expresamente, las muestras de larvas, farato-adultos y adultos de *Ceratitis capitata* se homogeneizaron en Potter de teflón - con 2-4 volúmenes de Sacarosa 0.25 M. Las muestras de hígado de rata con 1 volumen de sacarosa 0.25 M y las de tejido adiposo con 3 volúmenes de la misma disolución. Al homogeneizado se adicionó metanol (2.1 vol.) y luego cloroformo - 1 (vol.). La suspensión del material sólido en una sola fase líquida se agitó durante 30 minutos bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido el tiempo se adicionó cloroformo - (1 vol.) y agua destilada (1 vol.). Después de agitar energicamente en Mixer durante 30 segundos, se separaron dos fases líquidas por centrifugación a 900 G. durante 5 minutos recogiendo luego la fase inferior clorofórmica. La fase acuosa se extrajo tres veces con cloroformo (2 vol.). En cada extracción la separación de fases se llevó a cabo - por centrifugación. El extracto total obtenido se - lavó con 1/5 vol. del extracto de la fase superior - -

de un sistema constituido por cloroformo (3 ml), metanol (48 ml) y NaCl 0.58% (47 ml). Después de agitar y dejar reposar unos minutos se extrajo la fase inferior y se evaporó hasta sequedad en un evaporador rotatorio a 15-20 mm de Hg a una temperatura inferior a 37°C. El residuo se llevó a pesada constante y se calculó el rendimiento obtenido de lípidos totales.

Esquema:



2.2.2. Cromatografía en capa fina: lípidos neutros y lípidos polares.

Se utilizó cromatografía de capa fina en la separación de lípidos neutros y de lípidos polares. El desarrollo fue monodimensional en el primer caso en tanto que en la separación de lípidos polares se realizó desarrollo bidimensional. Las placas de cromatografía utilizadas fueron de 20 x 20 cm. y la extensión del soporte se efectuó con un extendedor Shandon. El soporte utilizado fue Silica Gel G (E. Merck, Darmstadt, Alemania) con un espesor variable según el tipo de cromatografía: 0.6 mm para lípidos neutros y 0.3 mm para lípidos polares. La suspensión de Silicagel G se preparó en cada caso inmediatamente antes de la extensión sobre las placas y de acuerdo con las siguientes proporciones:

30 g	de Silicagel G	por	60 ml	de H ₂ O	destilada:	0.3 mm
45 g	"	"	85 ml	"	"	: 0.6 mm

Las placas, una vez extendidas, se dejaron secar a temperatura ambiente, o bien se introdujeron en una estufa dos horas a 110°C.

Sistemas de desarrollo:

Los sistemas empleados para el desarrollo de las cromatografías fueron los siguientes:

lípidos neutros: n-hexano-eter etílico-ac. acético
(70:30:1, v/v/v).

lípidos polares: I) Cloroformo-metanol-amoniaco 7M
(90:54:11, v/v/v).

II) Cloroformo-metanol-ac. acético-agua
(90:40:12:2, v/v/v/v).

Una vez desarrollados los cromatogramas, se dejaron las placas a temperatura ambiente con el fin de que se evaporara el resto de disolvente.

El revelado de los lípidos se realizó introduciendo las placas en una cubeta saturada de vapores de yodo (Mangold, 1961; Sims, 1962). En poco tiempo, el yodo es retenido selectivamente sobre las regiones donde han quedado situadas las diferentes clases de lípidos, originándose manchas amarillas, perfectamente visibles, sobre el fondo blanco de la placa. Cada banda o mancha se identifica comparando su recorrido con el de los patrones, así como con la utilización de reveladores específicos. Una vez marcadas las manchas, se dejó sublimar el yodo completamente, y se rascaron cuidadosamente las manchas de las que se deseaba realizar determinaciones cuantitativas.

Reveladores específicos:

Reactivo de Dittmer: específico para compuestos conteniendo esteres del ácido fosfórico que aparecen como manchas azules sobre fondo blanco o grisáceo.

Reactivo de Ninhidrina: capaz de revelar lípidos tales como PS, PE y LPE que aparecen como manchas de color violeta después de calentar a 100°C durante 5 minutos.

Reactivo de Chergaff: específico de colina. Aparecen manchas verdes sobre fondo amarillo-verdoso.

Reactivo de Dragendorff: específico de compuestos con colina, tales como lecitinas, lisolecitinas y esfingomielinas.

Revelador de etanolamina: disolución de p-benzoquinona en n-butanol-piridina (4:1,v/v) dando una coloración roja. Específico de PE y LPE. No reacciona con la PC.

Revelador de glicolípidos: consiste en una solución de difenilamina que es específica de cerebrósidos, y gangliósidos.

Revelador de Inositol: específico de PI. Consiste en pulverizar con HNO_3 la placa, posteriormente se lleva a sequedad, se trata con una solución acuosa de CaCl_2 y NH_3 y se calienta a 180°C . Aparecen manchas que van desde el rojo al marrón-rojizo.

Revelador de hidroxiaminoácidos: específico de PS y fosfatidiltreonina. Se pulverizan las placas con una solución acuosa de metaperyodato sódico al 1% y se secan a temperatura ambiente. Luego se pulverizan con el reactivo Nessler (Merck).

2.3. ANALISIS CUANTITATIVO DE FOSFOLIPIDOS.

2.3.1. Análisis cuantitativo de fosfolípidos totales.

Una alícuota de los lípidos totales se depositó directamente en matraces Kjeldahl, y se procedió, previa eliminación del disolvente en estufa a 110°C , a su análisis según se describe en el apartado siguiente.

2.3.2. Análisis de fosfolípidos individuales.

Una alícuota de lípidos totales se aplicó mediante microjeringa en un punto sobre placas de Silicagel G de 0.3 mm, previamente lavadas mediante desarrollo en un sistema compuesto por: metanol-cloroformo-ác. fórmico (2:1:1, v/v/v) y secadas a temperatura ambiente durante una noche.

Las placas se desarrollaron en los sistemas I y II, mencionados en el apartado 2.2.2.. Los fosfolípidos se revelaron con vapores de yodo y se delimitaron las manchas correspondientes a: fosfatidil-colina, lisofosfatidil-colina, fosfatidil-etanolamina, lisofosfatidil-etanolamina, fosfatidil-serina y fosfatidil-inositol. Una vez sublimado el yodo mediante exposición de las placas durante cierto tiempo a temperatura ambiente, se rascaron las manchas correspondientes con una espátula y se transfirieron a matraces Kjeldahl.

El análisis del fósforo de las manchas se verificó según Rouser (1.966), con modificaciones de Casti-llón et al. (1971). Se adicionaron 0.9 ml de ácido perclórico al 70% a cada uno de los matraces y se introdujeron en un baño de arena durante 25 minutos a 250-260°C, con el fin de mineralizar el fósforo orgánico. Una vez transcurrido el tiempo se retiraron los matraces y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A cada matraz se le adicionaron 7 ml. de agua destilada y después 1 ml de molibdato anónico al 25% y 1 ml de ácido ascórbico al

10% (p/v). Los matraces se calentaron posteriormente en un baño de agua hirviendo, durante 7 minutos, al cabo de los cuales se detuvo la reacción por inmersión de los matraces en un baño de hielo. Seguidamente se centrifugaron las muestras para eliminar el ácido silíícico a 900 G durante cinco minutos, y por último, se leyeron las absorbancias a 820 nm en un espectrofóometro Coleman, Junior II, modelo 6/20, frente a un blanco que contenía: 0.9 ml de ácido perclórico, 7 ml de agua destilada, 1 ml de molibdato amónico al 2.5%, 1 ml de ácido ascórbico al 10%, sometido a las mismas condiciones de las muestras problema. Los μ g de fósforo de cada fosfolípido se obtuvieron contrastando las densidades ópticas frente a una curva patrón, consutruida con cantidades conocidas de KH_2PO_4 estandar.

2.4. ANALISIS CUANTITATIVO DE TRIGLICERIDOS.

Una alícuota de los lípidos totales se aplicó en una banda de unos 2-3 cm de longitud sobre placas de Silicagel G de 0.6 mm de espesor, activadas en la estufa durante una hora a 110°C, y se desarrollaron en el sistema de disolventes correspondiente a lípidos neutros (apartado 2.2). Una vez realizada la cromatografía y eliminado el disolvente a temperatura ambiente (o en estufa a 40°C durante una noche), las placas se some-

tieron a vapores de yodo para el revelado de las siguientes bandas: PL, MG, DG, AGL, TG y EC.

La mancha correspondiente a los triglicéridos, se rascó y se transfirió a un tubo de vidrio de boca esmerilada, de 19 mm de diámetro, con el fin de extraer los triglicéridos adsorbidos sobre la Silicagel G. El proceso de extracción se realizó del siguiente modo: se añadieron 10 ml de cloroformo, se agitaron los tubos 2 minutos, se centrifugaron 6 minutos a 900 \times G y se extrajo la fase clorofórmica. Esta operación se repitió dos veces. Las fases clorofórmicas se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio a baja presión. El residuo seco de triglicéridos se valoró de acuerdo con el método de Skidmore y Enteman (1962), basado en la transformación de los esteres en ácidos hidroxámicos que forman con el ion férrico un complejo coloreado que se determina colorimétricamente mediante lectura de las densidades ópticas a 530 nm en un fotocolorímetro frente a un blanco sometido a las mismas condiciones de las muestras problema.

Los μ moles de TG se obtienen interpolando las absorbancias en una curva patrón construida con una solución clorofórmica de tripalmitina, de concentración conocida.

2.5. ANALISIS CUANTITATIVO DE ACIDOS GRASOS LIBRES.

La valoración de ácidos grasos libres se - - realizó por determinación directa sobre los lípidos totales, según el método de Dole et al. (1960), modificado por Ko y Royer (1967).

Una alícuota de lípidos totales se extrajo - con una mezcla de alcohol isopropílico-n-heptano- H_2SO_4 -1 N (40:10:1, v/v/v). La fase orgánica que contenía - los ácidos grasos libres se recogió y se tituló con - - hidróxido de tetrabutilamonio 0.001 N, utilizando como indicador una disolución de timoftaleína 0.01% en acetona y gaseando continuamente con nitrógeno, con el fin - de evitar la disolución en el medio del CO_2 ambiental, que conduciría a una determinación errónea. De estos valores se sustrajo el obtenido para un blanco preparado en las mismas condiciones que las muestras. Los datos obtenidos se interpolan en una curva patrón realizada con distintos volúmenes a partir de una solución estándar de ácido palmítico.

2.6. ANALISIS DE COLESTEROL TOTAL.

Una alícuota de los lípidos totales se utilizó para valorar el colesterol libre y esterificado según el

método de Zak et al. (1954), modificado por Henly (1957). Se añadieron 1 ml de ácido acético glacial, 5 ml de una solución de FeCl_3 en ácido acético al 0.05% (p/v) y 3 ml de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agitó en Mixer treinta segundos y se centrifugó cinco minutos a 3.000 rpm. A continuación de treinta minutos de reposo, se midieron las absorbancias a 560 nm en un espectrofotómetro frente a un blanco en el que se sustituyeron los lípidos totales por 0.1 ml de NaCl al 0.9% (p/v). Las absorbancias obtenidas se contrastaron frente a una gráfica patrón, en cuya construcción se utilizó una solución de colesterol en ácido acético de concentración conocida.

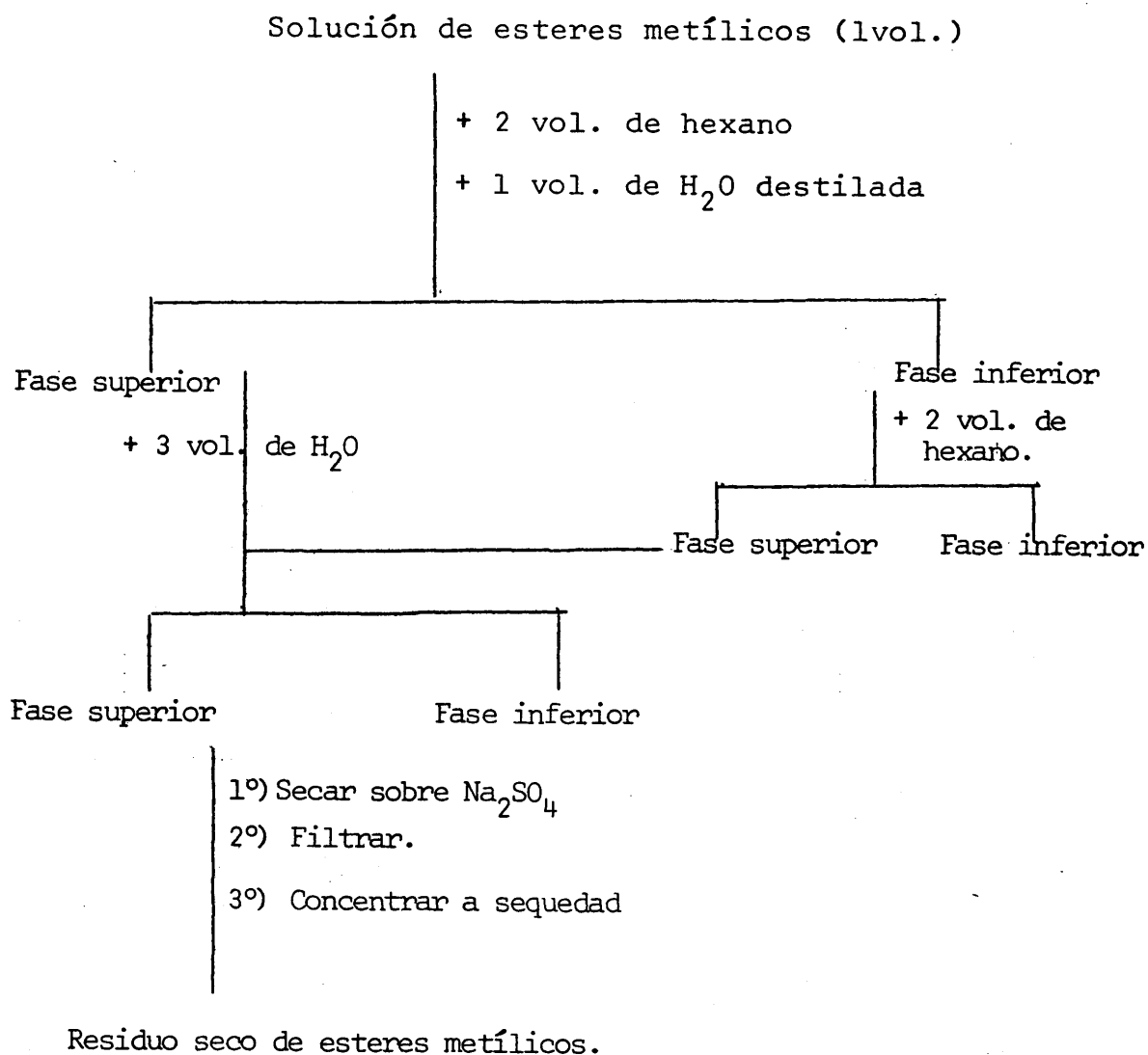
2.7. CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO.

2.7.1 Obtención de esteres metílicos.

Las metanolisis de ácidos grasos se llevó a cabo en muestras de lípidos totales, así como en triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres. La metanolisis (Metcalf et al. 1961) se realizó en tubos de vidrio de paredes gruesas de 20 x 150 mm donde se depositaron alícuotas de lípidos totales o en su caso el silicagel resultante de rascar la banda cromatográfica correspondiente a TG, PL o AGL.

Las placas se revelaron mediante la pulverización con Rodamina 6G en metanol e iluminación con luz ul-

travioleta. A cada tubo se adicionó 1 ml de metanol anhidro, 1 ml de trifluoruro de boro-metanol al 14% y 0.9 ml de benceno, por cada 10 mg de lípidos. Una vez cerrados los tubos a soplete, bajo atmósfera de nitrógeno, la mezcla se mantuvo a 110°C durante una hora y media. Una vez enfriados los tubos, se abrieron y la extracción de los esteres metílicos se realizó de acuerdo con el siguiente esquema:



El residuo seco se disolvió en 1 ml de hexano y se transfirió a ampollas las cuales se conservaron a -30°C hasta su análisis por cromatografía de gases.

2.7.2. Análisis de los esteres metílicos por cromatografía de gases.

El análisis de los esteres metílicos (disueltos en hexano) se efectuó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 5750, equipado con un detector de ionización de llama y columnas de acero inoxidable de 6 pies de longitud y 0.25 mm de diámetro interno, rellenas de polisuccinato al 20% sobre Cromosorb (80-100 mallas). Se operó a 180°C , siendo las temperaturas del detector e inyector de 250°C y 300°C , respectivamente.

Las áreas de los picos se determinaron con un integrador-impresor Hewlett-Packard, modelo 3370 A.

La identidad de los picos y validez cuantitativa de las concentraciones calculadas para los ácidos grasos, se establecieron por comparación con patrones de esteres metílicos de los diferentes ácidos grasos.

El grado de insaturación se calculó con la fórmula siguiente: $\text{grado de insaturación} = (\% \text{ de monoinsaturados}/100) + 2(\% \text{ de diinsaturados}/100) + 3(\% \text{ de triinsaturados}/100) + 4(\% \text{ de tetrainsaturados}/100)$.

2.8. RADIOCROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO.

2.8.1. Obtención de esteres metílicos.

Los ácidos grasos libres, o esterificados en lípidos complejos (triglicéridos y fosfolípidos) correspondientes a una alícuota de lípidos totales o a cada una de las fracciones lipídicas obtenidas por cromatografía en capa fina (reveladas pulverizando con Rodamina 6G, 0.1% en metanol e iluminación con luz ultravioleta), se metanolizaron transformándose en esteres metílicos de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.7.1.

2.8.2. Análisis de los esteres metílicos.

Los esteres metílicos, una vez extraídos y purificados se separaron e identificaron por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Perkin-Elmer, modelo F20FE con detector de ionización de llama, equipado con una columna de acero inoxidable (1.83 m x 0.31 cm), rellena con 10% de EGS sobre Cromosorb W(60-80 mallas). Como gas portador se utilizó helio, con un flujo de 18,3 ml/minuto y las temperaturas del inyector y detector fueron de 300°C y 200°C, respectivamente.

La radioactividad de los esteres metílicos se determinó a la salida de la columna cromatográfica por medio del contador proporcional Perkin-Elmer, modelo RGC170, conectado a la unidad cromatográfica por medio de un divisor

de flujo (relación de caudales, 16:1). Las temperaturas de las distintas partes del equipo fueron" contador proporcional, 100°C, horno de reacción, 620°C, tubo de conexión entre el divisor de flujo y el horno, 200°C.

Un único registro de doble canal recogió las señales o impulsos producidos por el detector de ionización de llama y la del contador proporcional, resultando dos gráficas superpuestas: la de cromatografía y la de radiactividad; ambas tienen un desfase de 0.5 minutos.

De esta forma se hizo corresponder perfectamente cada ácido graso identificado con su señal de radiactividad.

Las actividades específicas se expresaron convencionalmente, como cpm/unidad de área del pico-masa, calculada por triangulación.

2.9. TECNICAS RADIOSOTOPICAS.

2.9.1. Precursores radiactivos.

Todos los compuestos que se señalan a continuación fueron obtenidos de Amersham, Radiochemical Centre, Inglaterra.

Compuesto	Actividad específica	Pureza
Acido acético -1- ¹⁴ C (sal sódica)	59,3mCi/mmol	100%
Glicerol-2- ³ H(n)	500 mCi/mmol	95-98%
Ortofosfato- ³² P	1 mCi/ml	95-98%
NaH ¹⁴ CO ₃	59.9 mCi/mmol	99%
Adenosín-5-(γ ³² P) trifosfato (sal de amonio)	16.24 Ci/mmol	95-98%
Adenosín-3,5-monosfosfato-8- ³ H (sal de amonio)	16.24 Ci/mmol	95-98%
Gliceril-tri(1- ¹⁴ C) palmitato	64 mCi/mmol	97-99%
Acido cáprico-1- ¹⁴ C(10:0)	18.7 mCi/mmol	99%
Acido Láurico-1- ¹⁴ C(12:0)	28.8 mCi/mmol	98-99%
Acido Mirístico-1- ¹⁴ C(14:0)	45 mCi/mmol	98%
Acido Palmítico-1- ¹⁴ C(16:0)	57.9 mCi/mmol	98%
Acido Esteárico-1- ¹⁴ C(18:0)	59.7 mCi/mmol	99%
Acido Oleico-1- ¹⁴ C(18:1)	57 mCi/mmol	99%
Acido Linolénico-1- ¹⁴ C(18:2)	56 m/Ci/mmol	99%
Acido Linoléico -1- ¹⁴ C(18:3)	60 mCi/mmol	96-99%

2.9.2. Preparación de los homogeneizados.

En todos los casos la homogeneización se realizó en Potter-Elvehjem con émbolo de teflón y el sobrenadante obtenido de la centrifugación del homogeneizado se utilizó como "preparado enzimático".

En la incorporación de ácido acético-1- ^{14}C y de ácidos grasos-1- ^{14}C se utilizaron 2 g de material biológico en 6 ml de tampón sacarosa 0.35 M-Tris 0.05 M pH 7.4. El homogeneizado se centrifugó a 900 g durante 10 minutos a 4°C.

En la incorporación de glicerol-2- ^3H se homogeneizó 1 g de insectos en 2 ml de tampón sacarosa al 8.5% y el homogeneizado se centrifugó a 900 g durante 10 minutos.

La incorporación de ortofosfato- ^{32}P se llevó a cabo a partir de un homogeneizado de 1 g de material biológico en 6 ml de sacarosa al 8.5% que se centrifugó a 900 g durante 10 minutos.

2.9.3. Preparación de los medios de incubación.

El medio de incubación para la incorporación de ácido acético-1- ^{14}C (Municio et al., 1972) estuvo constituido por: ATP (6 $\mu\text{moles/ml}$), CoA (2 $\mu\text{moles/ml}$), NADPH (1 $\mu\text{mol/ml}$), MgCl_2 (2 $\mu\text{moles/ml}$), acetato sódico (2 $\mu\text{moles/ml}$) y estreptomicina (0.1mg/ml), y 20 μCi del isótopo, todo ello disuelto en tampón fosfato 0.05 M pH 7.4 en un volumen final de 1 ml. La incubación se realizó a 37°C a los

siguientes tiempos: 30, 60 y 120 minutos, en el caso de los insectos, y de sólo 60 minutos, en el de las ratas.

El medio de incubación para la incorporación de glicerol-2-³H (Nelson et al., 1972) estuvo constituido por: NaCl (60 μ moles/ml), MgCl₂ (0.05 μ moles/ml), KH₂PO₄ (2.5 μ moles/ml), NaHCO₃ (0.005 μ moles/ml), Tris-HCl (0.003 μ moles/ml), y 10 μ Ci del isótopo, todo ello disuelto en H₂O destilada, en un volumen final de 1 ml. La incubación se realizó a 37°C a 2 tiempos: 2 y 4 horas.

El medio de incubación en el caso de la incorporación de ortofosfato-³²P (Williams et al., 1970) estuvo constituido por: sacarosa (50 μ moles/ml), MgCl₂ (6 μ moles/ml), fructuosa 1,6-difosfato (5 μ moles/ml), -NADH (2.5 μ moles/ml), CMP (0.5 μ moles/ml) y 25 μ Ci del isótopo, todo ello disuelto en H₂O destilada, en un volumen final de 2 ml. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 15, 30, 60 y 120 minutos, en el caso de los insectos, y sólo durante 60 minutos en el caso de las ratas.

La incorporación de ácidos grasos-1-¹⁴C en insecto se realizó utilizando un medio de incubación (Municio et al., 1974) constituido por: ATP (6 μ moles/ml), CoA (2 μ moles/ml), NADPH (1 μ mol/ml), MgCl₂ (2 μ moles/ml), en tampón de fosfato potásico 0.05 M pH 7.4 (22 μ moles/ml), estreptomicina (1 mg/ml) y 2 μ Ci del ácido graso marcado. Los ácidos grasos marcados, reseñados en el apartado 2.9.1., fueron suspendidos en tampón de fosfato potásico y la mezcla se sonicó durante 2 minutos antes de adicionarlos a la mezcla de incubación (0.20 μ moles/ml). Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 180 minutos.

En el caso de ratas el medio de incubación (Nugteren et al., 1965) estuvo constituido por: ATP (15 μ moles/ml), NADPH (1 μ mol/ml), $MgCl_2$ (3 μ moles/ml), AcNa (4 μ moles/ml), estreptomicina (0.2 mg/ml) y 10 μ Ci del isótopo - todo ello disuelto en tampón de fosfato potásico pH 7.4. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 180 minutos.

2.9.4. Medidas de radiactividad por centelleo líquido.

La radiactividad incorporada a los lípidos totales o a las distintas clases de lípidos y en las medidas radioenzimáticas, se determinó por centelleo. Se utilizaron 4 líquidos de centelleo:

Dioxano-Naftaleno (Snyder, 1964): 10.5 g PPO, 0.45 g POPOP, 150 g de naftaleno, 1500 ml de dioxano y 300 ml de H_2O destilada. Dioxano-naftaleno con etilén-glicol (Kaplan, 1970): 9 g PPO, 0.45 g POPOP, 45 g de naftaleno, 150 ml de etilén-glicol y 750 ml de dioxano. Instagel (Packard). Tolueno (Packard). Las medidas de radiactividad se realizaron en un contador de centelleo Unilux II, Nuclear Chicago, modelo 6766.

2.10. ENSAYOS RADIOENZIMATICOS.

2.10.1. Triglicérido-lipasa.

Se siguió el método de Kaplan (1970). La homogeneización se realizó según el apartado 2.9.2. El homogeneizado se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos en una centrifuga refrigerada Sorvall modelo RC2-B. El sobrenadante se utilizó como preparado enzimático.

El sustrato radiactivo para el análisis enzimático conteniendo 50 μCi de tripalmitina- $1\text{-}^{14}\text{C}$, 600 μmoles de tripalmitina no marcada (Sigma) y 5 ml de goma de acacia al 15%, se emulsionó por sonicación durante 2 minutos a temperatura ambiente según Gorin et al. (1964), utilizando para ello un MSE "ultrasonic desintegrador". En cada tubo se depositó 0.1 ml del sustrato radiactivo así preparado que corresponde a 0.83 μCi y 10 μmoles de tripalmitina- $1\text{-}^{14}\text{C}$ por tubo (aproximadamente, 1×10^6 cpm) y se le añadió 0.5 ml de un tampón 0.1 M fosfato sódico pH 6.8, y 0.5 ml del preparado enzimático. La incubación se realizó a 37°C y durante 30 minutos.

Las condiciones cinéticas enzimáticas óptimas fueron determinadas previamente.

La reacción se detuvo mediante la adición a cada tubo de 6 ml de isopropanol-heptano- H_2SO_4 1N(40:10:1, v/v/v) y se procedió a la extracción de los ácidos grasos liberados mediante los siguientes pasos: Se agitaron los tubos 1 minuto y se dejaron reposar durante 5 minutos. Se adicionaron a los tubos 3 ml de heptano y 2 ml de H_2SO_4 0.1 N, se agitaron 1 minuto en Mixer y se tomaron 3.5 ml de la fase de heptano (fase superior) para depositarlos en tubos conteniendo 1.5 ml de NaOH 0.1 N en etilén-glicol. Se agitaron los tubos 2 minutos y se separó la fase de heptano. La fase alcalina de etilén-glicol (1 ml) se llevó a viales de conteo para conteo líquido, conteniendo 10 ml de dioxano-naftaleno en etilén-glicol (apartado 2.9.4.).

La actividad enzimática se expresó como μmoles de ácido graso liberado/mg proteína/hora/ml de extracto. Paralelamente se ensayaron blancos que contenían tampón - fosfato y el sustrato radiactivo y en las que el preparado enzimático fue sustituido por 0.5 ml de sacarosa - 0.25 M. Todos los ensayos se efectuaron por triplicado.

2.10.2. AcetilCoA-carboxilasa.

Larvas de 6 y 7 días farato-adultos de 1 día se utilizaron para la determinación de la actividad enzimática de AcCoA-carboxilasa. Se homogeneizaron directamente con tres volúmenes de tampón Tris-HCl pH 7.4, en un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio con émbolo de teflón y filtrado a continuación a través de capas de gasa. Una vez realizado este proceso se centrifugó el homogeneizado obtenido en una centrifuga refrigeradora Sorvall a 900 g - durante 10 minutos. Del producto de la centrifugación se desechó el sólido utilizando la fracción soluble que es la que contiene la enzima.

El medio de incubación (Gregolin et al., 1966 ; Municio et al., 1972) estuvo constituido por: mercapto- - etanol (25 μl /tubo), KHCO_3 (10 $\mu\text{moles/ml}$), MgCl_2 - - (2 $\mu\text{moles/ml}$), citrato potásico (3 $\mu\text{moles/ml}$), ATP - - (6 $\mu\text{moles/ml}$), acetilCoA (1.5 $\mu\text{moles/ml}$) y 5 μCi de - -- $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, todo ello disuelto en tampón de fosfato potásico 0.05 M pH 7.4, (20 $\mu\text{moles/ml}$), en un volumen final de 0.5 ml. La incubación se realizó a 37°C durante 30 minu-

tos. La reacción se detuvo añadiendo inmediatamente -
 0.1 ml de HCl 6 N que además de desnaturalizar la pro- -
 teína, impidiendo así la continuación de la reacción, - -
 sirvió para eliminar el bicarbonato no reaccionante - -
 desplazándolo de la mezcla de incubación en forma de - -
 CO_2 .

Una vez añadido el HCl se llevaron los tubos -
 a un desecador con NaOH, en el que se hizo el vacío hasta
 la total sequedad. Posteriormente, se añadieron 0.2 ml -
 de HCl 1N realizando un lavado de las paredes del tubo pa
 ra asegurarse de la total expulsión del CO_2 radiactivo no
 reaccionante de la mezcla de incubación y evitar así su -
 influencia en el posterior conteo de la radiactividad.
 Se añadieron 2 ml de líquido de centelleo de dioxano-nafta
 leno (apartado 2.9.4) y se midió la radiactividad en un -
 espectrofotómetro de líquido de centelleo de baja tempera
 tura Nuclear Chicago modelo 6766.

2.10.3. Medida de la actividad de proteína-quinasa.

Los insectos se homogeneizaron directamente en -
 1-2 volúmenes de sacarosa 0.32 M en un homogeneizador de
 vidrio Potter-Elvehjem con émbolo de teflón. El homoge- -
 neizado se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos a -
 0-4°C. El sobrenadante constituyó el extracto enzimático.
 Se siguió en este caso el método de Reiman et al. (1971)
 modificado por Catalán et al. (1974).

El contenido de cada tubo fue el siguiente: -

EGTA (1.2mM), EDTA (0.8mM), MgCl_2 (40 mM) y NaF (0.12mM) en tampón acético-acetato sódico 0.2 M pH 6.0; 2.0 mg/ml de histona total de timo de ternera (tipo IIA, Sigma), - 25 μ litros de γ - ^{32}P -ATP 0.4mM en H_2O) y 50 μ litros de preparado enzimático.

Los tubos se incubaron 5 minutos a 37°C. La reacción se inicio añadiendo el isótopo y se detuvo añadiendo 0.5 ml de TCA 10% y 0.1 ml de albúmina de bovino (fracción V) (1 mg/ml). Se dejaron reposar durante 30 - minutos a 0-4°C y se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000 rpm. El sedimento se disolvió en 1 ml de TCA 10%. Se centrifugaron de nuevo y el sedimento se lavó dos veces con 1 ml de TCA al 5%. Finalmente, el precipitado - se disolvió en 0.1 ml de ácido fórmico 98% y se contó la radiactividad en 10 ml de dioxano-naftaleno (apartado - 2.9.4.) en un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago modelo 6766.

Cada medida se realizó por triplicado. Una - unidad de proteína quinasa se define como la cantidad de enzima que transfiere 1 pmol de ^{32}P /minuto del ATP a la histona.

La actividad de proteína quinasa se determinó según el método de Sudilowsky et al (1972) en el caso de hígado de rata.

Las muestras se homogeneizaron directamente en - la proporción 1 g de tejido/4 ml de tampón SPE (Sudi- - lovsky et al., 1974) consistente en sacarosa 0.25 M y

EDTA 4 mM en tampón fosfato sódico 10 mM pH 6.5 utilizando un Potter Elvehjem con émbolo de teflón. El homogeneizado se centrifugó a 25.000 g durante 10 minutos a 0-4°C. El sobrenadante se tomó para medir la actividad de proteína-quinasa. Cada medida se realizó por triplicado.

Cada tubo contenía un volumen total de 0.2 ml constituido por : Tris-HCl 50 mM, pH 6.5, $MgCl_2$ 5 mM, 0.225 mg/ml de histona total de timo de ternera tipo IIA (Sigma), (γ - ^{32}P) ATP 12.5 μ M (10^6 cpm/ tubo aproximadamente) y 25 μ l de preparado enzimático.

La incubación y todo el tratamiento posterior se realizó como en insectos.

2.10.4. Medida de la actividad ligante de AMP cíclico.

Se procedió según el método de Anderson et al. (1.971). Las muestras se homogeneizaron en 1-2 volúmenes de Tris 50 mM pH 7.5, en un homogeneizador de vidrio Potter-Elvehjem, con émbolo de teflón. Los homogeneizados se centrifugaron 10 minutos a 15.000 g entre 0-4°C. El sedimento se despreció y el sobrenadante se utilizó como preparado enzimático. El ensayo se realizó siempre por triplicado. Cada tubo contenía: 50 µl de una solución 10^{-7} M de ^3H -AMPc, 10 mM de 5'-AMP en Tris 50 mM pH 7.5 y 50 µl de preparado enzimático.

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 0-4°C. La incubación se llevó a cabo a 0°C durante 5 minutos, y la reacción se detuvo añadiendo 0.5 ml de albúmina bovina (1 mg/ml). Se dejó reposar 30 minutos y la suspensión se filtró a través de filtros Millipore (0.45 µm) de 25 mm de diámetro. Los filtros se lavaron con 10 ml de solución saturada de sulfato amónico, se secaron y se contaron en 10 ml de líquido de centelleo dioxano-naftaleno (apartado 2.9.4). La unión no específica se determinó añadiendo 10 nmoles de AMPc a la mezcla de ensayo (Emmer et al., 1.970).

Una unidad de actividad ligante de AMPc se define como la cantidad de proteína requerida para unir 1 pmol de AMPc.

2.10.5. Medida de la actividad de fosfodiesterasa.

Se siguió el método de Rojakovick et al. (1.974) modificado por Catalán et al. (1.975). Las muestras se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio Potter-Elvehjem con émbolo de teflón, en la proporción de 1 g de material biológico/ 1-2 ml de tampón Tris 40 mM pH 8.0. El homogeneizado se centrifugó 10 minutos a 800 g a 0-4°C. El sedimento se despreció y el sobrenadante se utilizó como preparado enzimático. Cada medida se realizó por triplicado. Cada tubo contenía: 25 μ l de $MgCl_2$ 20 mM en tampón Tris 40 mM pH 8.0; 50 μ l de preparado enzimático equivalente a 1-2 mg de proteína y 25 μ l de una solución 4×10^{-7} M de 3H -AMPc en tampón Tris 40 mM pH 8.0.

La incubación se realizó a 35°C durante 12 minutos, y la reacción se detuvo calentando durante 3 minutos en un baño de agua a ebullición. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 800 g y se recogió el sobrenadante; se adicionaron al sedimento 50 μ l de Tris 40 mM pH 8.0, se agitaron y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante obtenido se añadió al anterior. El 3H -5'-AMP se separó del 3H -AMPc que no reaccionó y de otros nucleótidos que se pudieron formar en la reacción por cromatografía descendente en papel Whatman 3MM. De cada muestra se tomaron 25 μ l a los que se adicionaron 25 μ l de AMPc, 25 μ l de 5'-AMP y 25 μ l de hipoxantina (HX) como portadores (todas las soluciones 5 mM).

Los cromatogramas se desarrollaron durante 20 - horas en un sistema constituido por acetato amónico 1M-etanol 95% (3/7). El revelado se realizó mediante luz ultravioleta a 260 nm, ya que la adenina tiene un grupo cromóforo que absorbe a esta longitud de onda. La identidad de - cada mancha se dedujo de la comparación entre su R_f con el R_f de sustancias patrón conocidas. En la figura 4 se - - puede ver la disposición de las manchas en un cromatograma tipo. Las manchas de 5'-AMP se recortaron y se contaron en 20 ml del líquido de centelleo de tolueno. La actividad - se expresa como pmoles de 5'-AMP formado/mg de proteína/minuto.

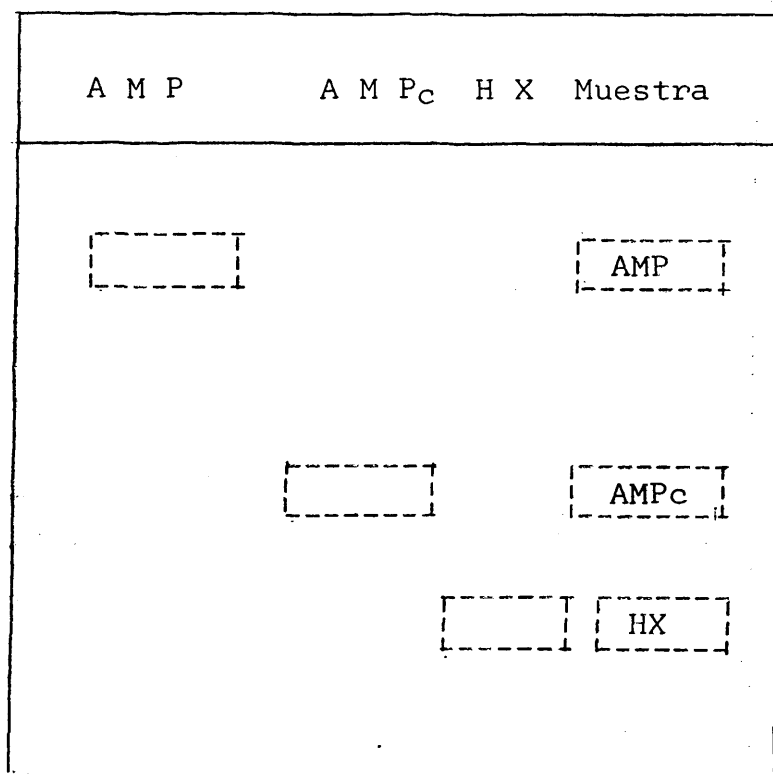


Figura 4

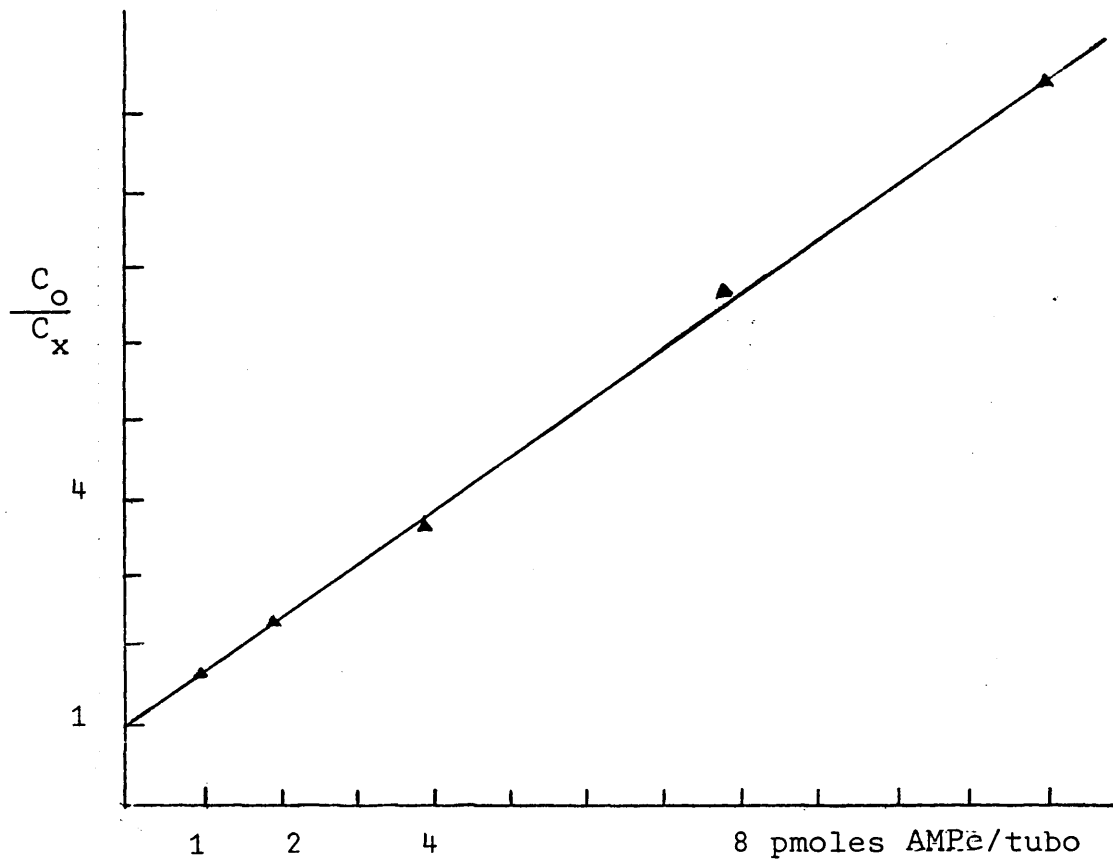


Figura 5

2.11. DETERMINACION DE NIVELES DE AMPc.

La determinación de AMPc mediante una proteína ligante endógena, según Brown et al. (1970 y 1971), con algunas modificaciones. Se utilizó una proteína ligante aislada de músculo bovino (Miyamoto et al., 1969), debido a su favorable constante de unión al AMPc. El ensayo está basado en la competencia entre el AMPc no marcado y una cantidad fija de ^3H -AMPc por unirse a una proteína que tiene una alta especificidad y afinidad por el AMPc. La cantidad del com-

plejo ^3H -cAMP-proteína formada está relacionada inversamente con la cantidad de AMPc no marcado presente en la muestra.

La separación del AMPc unido a la proteína del AMPc no unido, se llevó a cabo por adsorción del nucleotido libre sobre carbón activo, seguido de centrifugación. Se tomó entonces una alícuota del sobrenadante y se contó. La concentración de AMPc en la muestra se determinó a partir de una curva estandar lineal. El ensayo se realizó por triplicado. Todas las operaciones se llevaron a cabo por debajo de 4°C . Las muestras se desproteinizaron según el método de Cooper et al. (1972). Se dispusieron los tubos en un baño de hielo-agua, 21 tubos más los adicionales necesarios para las muestras. A los 3 primeros se añadieron 150 μl de EDTA 4 mM en tampón Tris 0.05 M pH 7.5; estos tubos tienen como finalidad determinar las cpm del blanco para el ensayo. En los tubos 4, 5 y 6 se pipetearon 50 μl de este mismo tampón para la determinación de la capacidad ligante en ausencia de AMPc no marcado. La curva estandar se construyó con los tubos 7-21; a cada tres tubos se añadieron 1, 2, 4, 8 y 16 pmoles de AMPc respectivamente, en 50 μl de EDTA 4 mM en Tris 0.05M pH 7.5. En los tubos dispuestos para las muestras problema, se adicionaron 50 μl del extracto correspondiente. A continuación se añadieron 50 μl de una solución de ^3H -AMPc (180 pmoles de ^3H -cAMP conteniendo aproximadamente 5 μCi en 10 ml de H_2O) y 100 μl de la solución de proteína ligante (exceptuados los blancos). Se agitaron du-

rante 5 segundos y se mantuvieron 120 minutos a 2-4°C.

15 minutos antes del final del tiempo de incubación se añadieron 2 ml de H₂O al carbón activo y se agitaron continuamente en un agitador magnético. Se adicionaron 100 µl de la suspensión de carbón a todos los tubos, agitando durante 10-12 segundos. Se tomaron luego 200 µl de sobrenadante de cada tubo y se contaron en 10 ml de Instagel (apartado 2.9.4). Las cpm se calcularon promediando los tres tubos. La radioactividad de los tubos 4, 5 y 6 menos el blanco, son las cpm ligadas en ausencia de AMPc (C). De la diferencia entre las cpm de cada muestra y las cpm del blanco, se obtuvieron las cpm ligadas en presencia del estandar o de la muestra desconocida (C_x). Se calculó C_o/C_x para cada punto y se representó frente a los pmoles de AMPc inactivo por tubo. Se obtuvo así una recta que cortó al eje de ordenadas en 1 (figura 5). A partir de esta curva estandar, teniendo en cuenta el valor de C_o/C_x de cada muestra, se puede conocer la cantidad de AMPc.

La linearización de la curva y los valores de las muestras problemas se obtuvieron por el método logit-log (Rodbard et al. 1969) utilizando un computador Hewlett-Packard 2116 B.

Con la finalidad de calcular actividades enzimáticas específicas y hacer comparables los resultados obtenidos en todos los preparados enzimáticos, se efectuó una valoración de proteínas según el método de Lowry et al. (1951).

En el momento de efectuar el análisis, se preparó una mezcla del reactivo A (Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N) con reactivo B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en tartrato sódico al 1%) en la proporción 50 volúmenes de A + 1 vol. de B. En tubos de ensayo se depositaron 5 ml de esta mezcla; se añadieron a cada uno de ellos 1 ml de la solución problema, cuyo contenido en proteínas esté comprendido entre 150 y 800 $\mu\text{g/ml}$. La mezcla, después de agitar, se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se añadió a cada tubo 0.5 ml del reactivo Folin diluído 1:2 (v/v). La mezcla se dejó 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se midió su absorbancia a 500 nm frente a un blanco constituido por una mezcla preparada según se especifica anteriormente, sustituyendo la solución problema por 1 ml de H_2O destilada, en un espectrofotómetro Coleman Junior II.

La concentración de proteínas se dedujo a partir de una curva estandar construída con los datos de absorbancia obtenidos con diferentes disoluciones de albúmina de bovino (Sigma) de concentración conocida.

3.1. EFECTOS DEL CPIB EN EL DESARROLLO Y LA REPRODUCCION DE CERATITIS CAPITATA

Se han estudiado las variaciones sufridas por el peso, el tiempo de aparición de la apolisis larva-pupa, la toxicidad y la fecundidad de *Ceratitis capitata* en distintos estadios de su desarrollo a consecuencia de la administración del CPIB en la dieta larval.

3.1.1. Variaciones en el peso

En la figura 6 se registra el efecto producido por distintas concentraciones de CPIB en el peso de *Ceratitis capitata* a lo largo de su desarrollo. El peso va disminuyendo, comparado con los valores de los insectos controles, a medida que aumenta la concentración de CPIB. La disminución en el peso va creciendo a lo largo del desarrollo y alcanza una disminución del 50% en el caso de adultos recién emergidos.

Kokatnur et al.(1967) y Greene et al.(1970) destacan una reducción, inducida por el CPIB, en el peso de ratas con respecto al de las ratas a las que se administra dieta sin la droga.

Es probable que el efecto hipolipidémico del CPIB, bien conocido en mamíferos, ocasione una disminución del depósito graso de la larva, disminuyendo su peso. El farato-adulto, cuyas reservas son prácticamente las del estadio anterior, aprovecha éstas de tal modo

que el adulto emerge sin reservas, por lo que el efecto - del CPIB se acusa más profundamente en este último estadio. La recuperación del adulto se realiza en pocos días al suministrarle el alimento adecuado ausente de CPIB.

3.1.2. Efectos del CPIB en la apolisis larva-pupa.

La figura 7 representa el efecto de distintas - concentraciones del CPIB en el momento de la apolisis larva-pupa de *Ceratitis capitata*, referido a insectos controles. A una concentración del 4%, el CPIB produce un retraso en la apolisis aproximadamente de dos días.

Se comprobó que este retraso se debía únicamente al CPIB, utilizando insectos controles sometidos a severas condiciones de ayuno que alcanzaron la apolisis anticipándose a los insectos alimentados en una dieta normal, sin CPIB. Este hecho concuerda con los datos señalados por House (1965).

Levinson et al.(1973) han demostrado que la ingestión de CPIB en *Dermestes maculatus* (Coleóptera) añade seis días al tiempo requerido para conseguir un 50% de pupación (apolisis larva-pupa) y veinticuatro días para la finalización del proceso de madurez en comparación con - los controles. Por otra parte, diversos agentes químicos producen, también, retrasos o inhibiciones de la metamorfosis (Mulla Mir et al.,1976;Harwalkar,1975).

A la vista de estos resultados, el CPIB se revela capaz de detener el ritmo de crecimiento y desarrollo

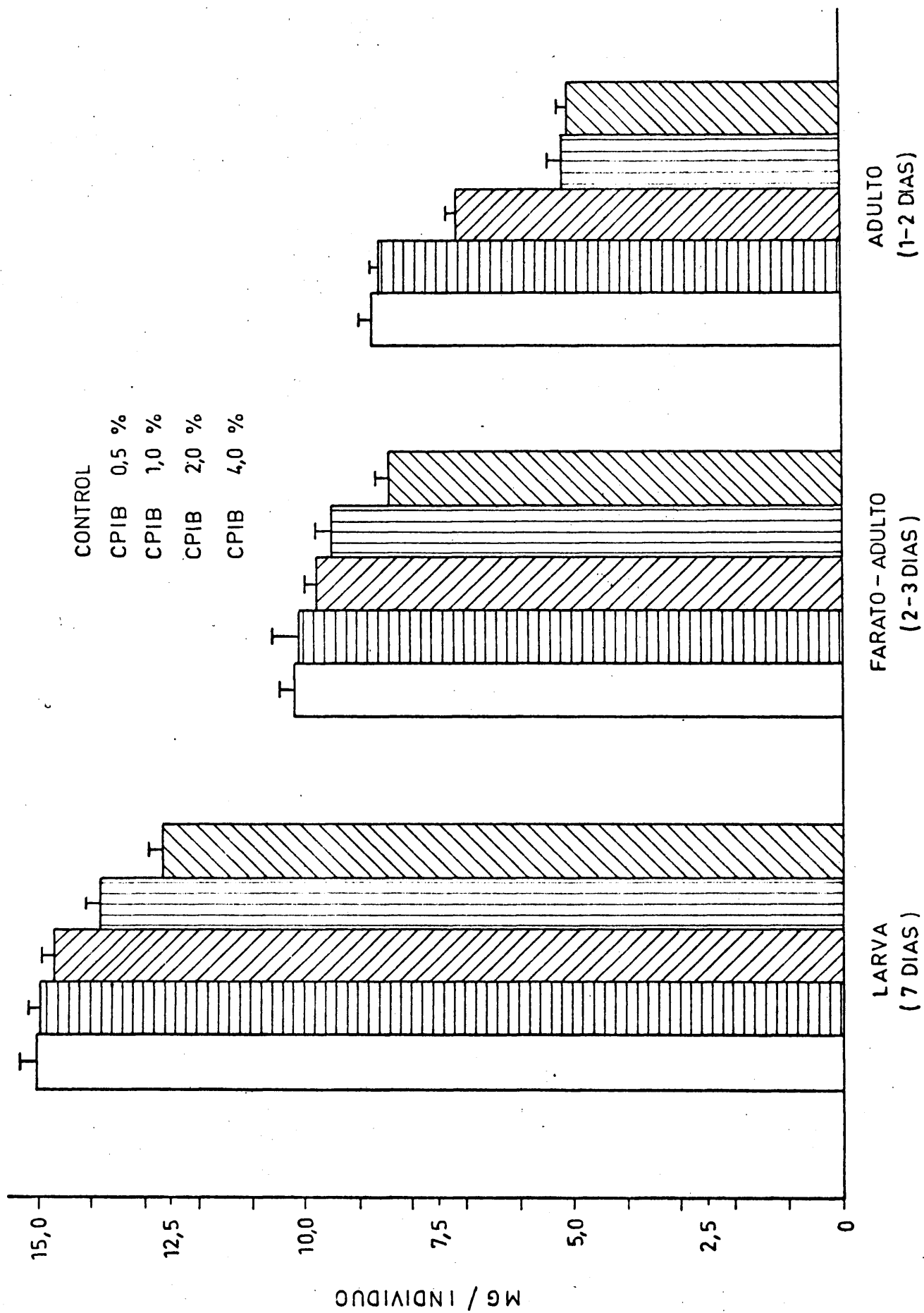


Figura 6.-

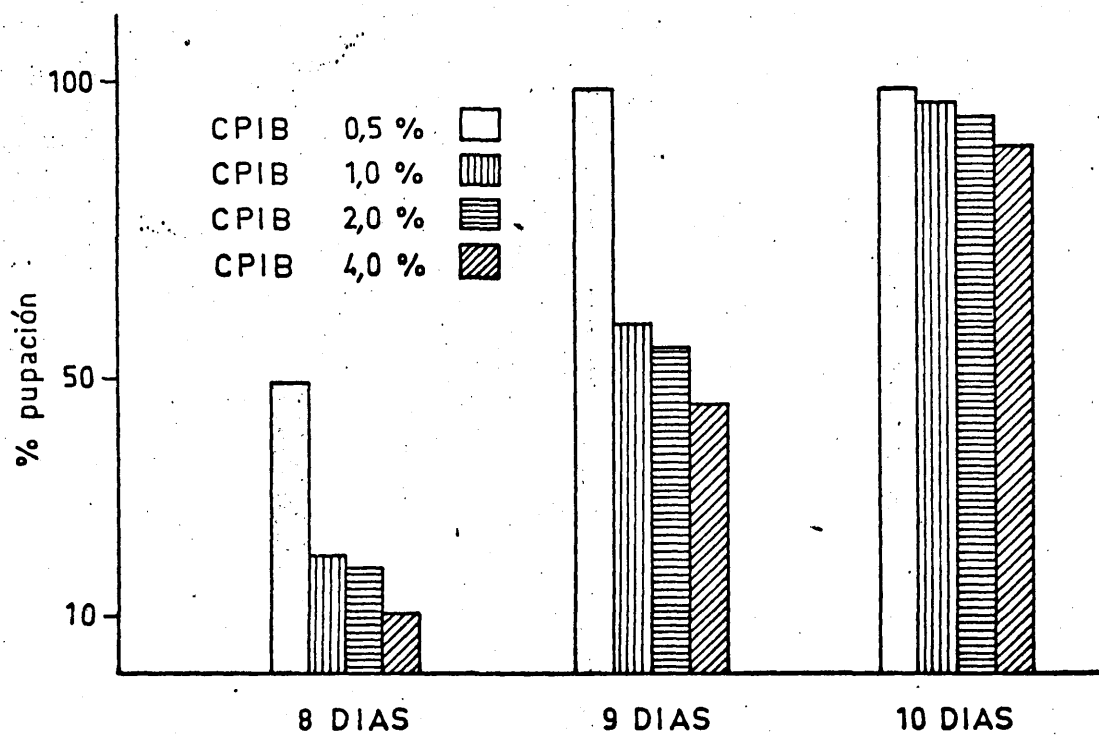


Figura 7.-

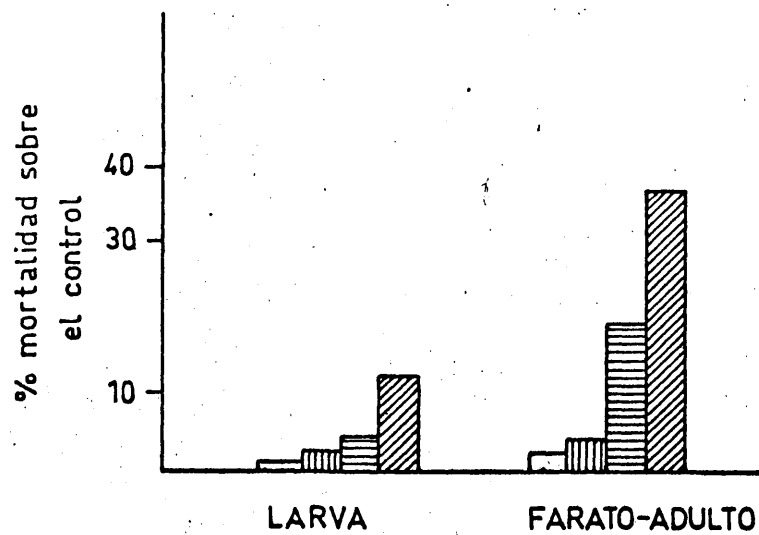


Figura 8.-

normales del insecto, interfiriendo de alguna manera en los procesos que implica la metamorfosis dependientes de distintos metabolitos, y de mecanismos de regulación tanto enzimáticos, como hormonales y nerviosos (cfr. introducción 1.4.1.). Desde este punto de vista, es necesario señalar la semejanza de efecto del CPIB con la administración por vía digestiva de HJ que produce una prolongación de la vida larval (Socha 1973; Reddy 1973; Fytizas 1975).

3.1.3. Toxicidad relativa

En la figura 8 se muestra la toxicidad relativa del CPIB en *Ceratitis capitata* como porcentaje de mortalidad sobre insectos controles. La toxicidad va aumentando a medida que aumenta la concentración del CPIB en la dieta larval. Dosis de CPIB correspondientes a un 6% en la dieta, alcanzan un 50% de mortalidad.

Levinson et al. (1973) señala una mortalidad larval del 50% en *Dermestes maculatus* cuando el CPIB se encuentra a concentraciones oscilando entre 0.5-1%.

Desde el punto de vista comparativo, CPIB al 1% en la dieta de ratas ocasiona ya lesiones hepáticas, siendo su DL_{50} , por vía oral, de 1.950 mg/kg (Ayerst Lab, 1967)

Los resultados obtenidos en *Ceratitis capitata* muestran una mayor resistencia a la acción tóxica de la droga, hecho que podemos interpretar en el contexto de otras investigaciones (Madariaga et al., 1970) que señalan

la resistencia de este insecto a condiciones ambientales y de nutrición extremadamente duras.

3.1.4. Efectos en la fecundidad.

La figura 9 expresa el efecto del CPIB en la fecundidad en *Ceratitis capitata*. Se puede observar una disminución en la capacidad de oviposición del insecto a consecuencia de la administración de CPIB en la dieta larval. Esta inhibición en la fecundidad es mayor cuanto mayor es la concentración de la droga. En el caso de insectos tratados con CPIB al 4% en la dieta larval, se manifiesta un retraso en la oviposición, posiblemente debido al retraso que esta concentración del CPIB produce en la apolisis larva-pupa, y una disminución de la fecundidad, con respecto al control, que va recuperándose a medida que progresa el desarrollo.

Insectos machos y hembras controles se cruzaron con insectos tratados con CPIB al 4% según todas las posibilidades: hembras normales con machos tratados, hembras tratadas con machos normales y hembras tratadas con machos tratados. Los resultados de estos cruzamientos se expresan en la figura 10.

El efecto inhibitor del CPIB sobre la fecundidad recae especialmente sobre las hembras.

Los insectos son particularmente vulnerables

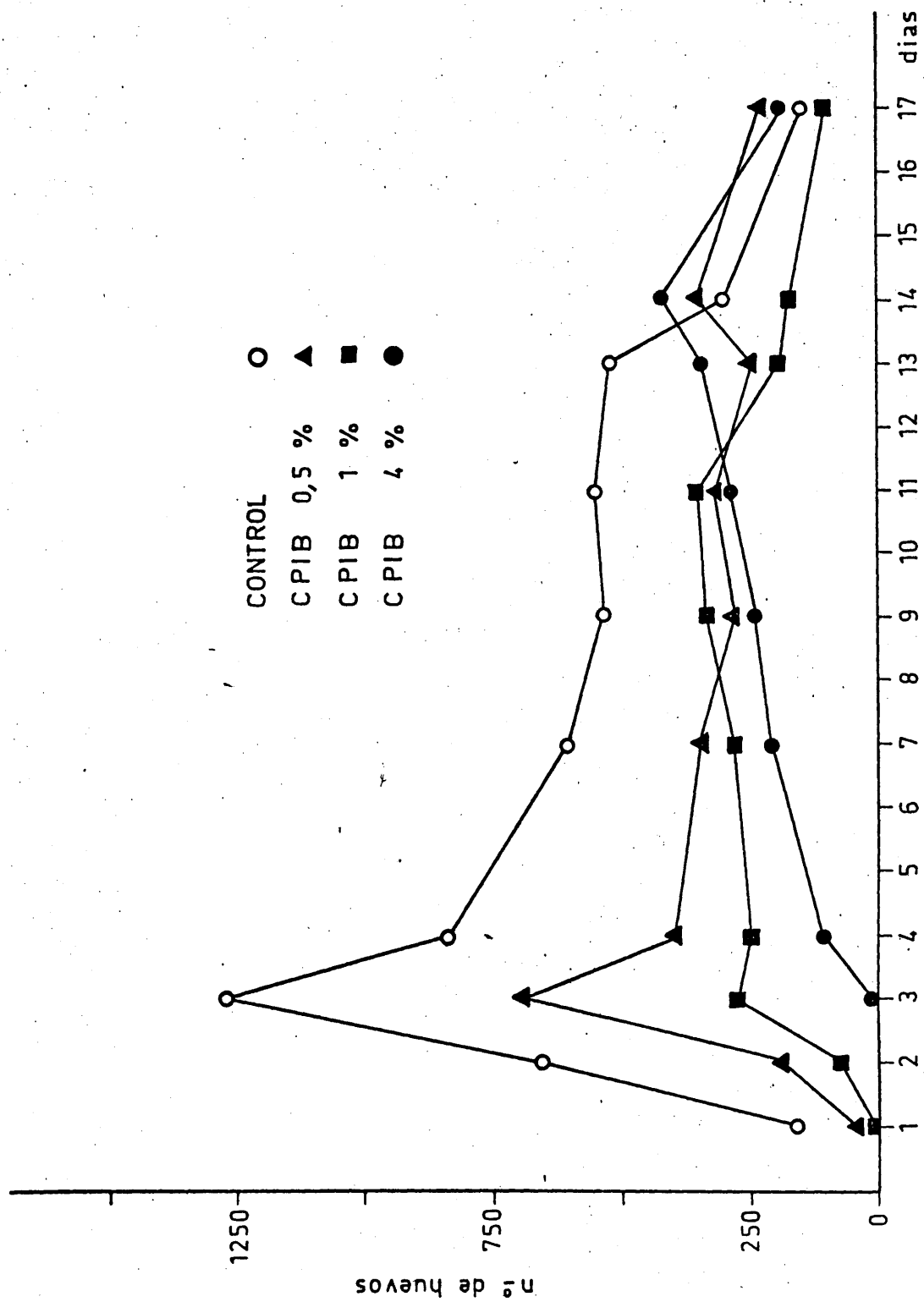
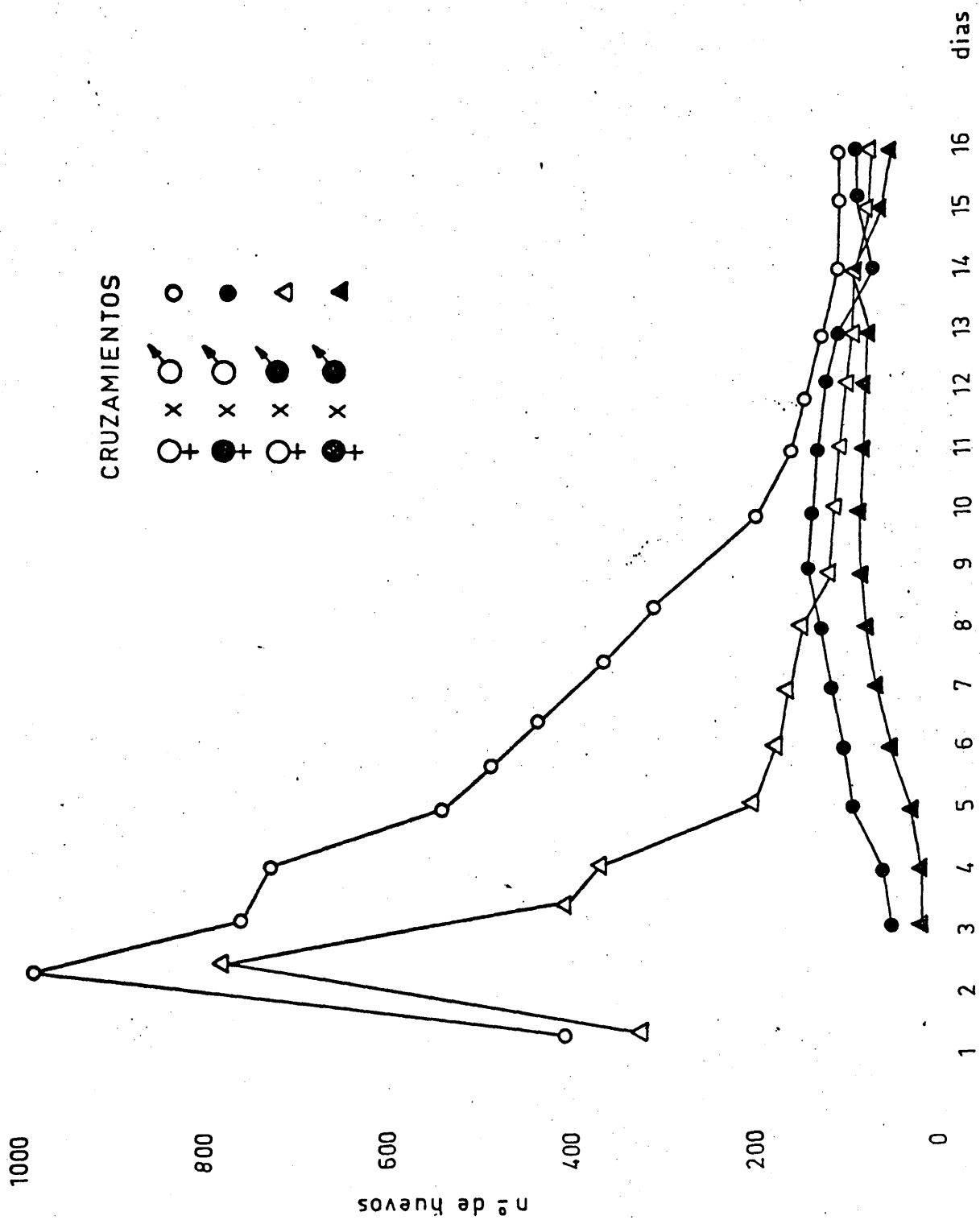


Figura 9.-



al agotamiento o reducción de las reservas lipídicas, especialmente durante la oogénesis y el crecimiento, por lo que la acción del CPIB sobre el metabolismo lipídico tendrá un poder insect^oistático. Esta acción insect^oistática del CPIB es reflejada por Levinson et al. (1973) en el caso de *Dermestes maculatus*.

Ciertos antimetabolitos producen un efecto esterilizante similar al del CPIB, sobre las hembras de *Ceratitis capitata* (Navvab et al. 1974) y otras especies de insectos (Borkovec 1966; Matolin 1973; Ansari 1973; Ivashchenko 1973; Sukuman 1976). Particularmente notable es el efecto esterilizante similar al del CPIB de análogos de la HJ en insectos (Rens, 1974).

Por otro lado, la interacción del CPIB con la función reproductora en mamíferos se ha demostrado (Pantaleoni 1974). El efecto de antifertilidad de la droga se atribuye especialmente a las hembras.

No se conoce el mecanismo mediante el cual el CPIB produce este efecto esterilizante, como tampoco aquel por el que ocasiona un retraso en la metamorfosis, pero cabe pensar que su efecto hipolipidémico, bien conocido en mamíferos, y estos efectos fisiológicos estén relacionados.

3.2. EFECTOS DEL CPIB EN EL METABOLISMO LIPIDICO DE CERATITIS CAPITATA.

Se han estudiado los efectos de distintas concentraciones del CPIB sobre los niveles de ácidos grasos libres, triglicéridos, fosfolípidos totales y colesterol total de *Ceratitis capitata* a lo largo del desarrollo, - con objeto de comparar los resultados obtenidos a nivel fisiológico con el efecto hipolipidémico del CPIB.

3.2.1. Efectos del CPIB sobre ácidos grasos libres.

En la figura 11 se reflejan los niveles de ácidos grasos libres de *Ceratitis capitata* a lo largo de su desarrollo en insectos controles y en insectos tratados - con CPIB al 1% y al 4% en la dieta larval. Los valores de los controles oscilan entre 20-40 nmoles/mg de lípidos totales, en los distintos estadios de desarrollo.

Estos niveles disminuyen significativamente - - cuando a la larva se le administra en la dieta CPIB, en el farato-adulto de 2 días y en el adulto recién emergido, y aumentan significativamente en larva de 7 días y - en el farato-adulto de 7 días. Estas diferencias aumentan con el incremento de concentración del CPIB en la - dieta.

Las variaciones de la concentración de ácidos grasos a lo largo del desarrollo pueden representar una

relación estrecha entre el metabolismo de los ácidos grasos y la regulación del desarrollo del insecto a nivel hormonal. El incremento de los niveles de ácidos grasos coincide justamente en los dos momentos más significativos del desarrollo del insecto a partir de la eclosión del huevo: el momento de la apolisis larva-pupa (larva de 7 días) y el momento de la emergencia del adulto (farato-adulto de 7 días) (cf. apartado 2.1.1.). En estos momentos tienen lugar importantes procesos histolíticos e histogénicos cuyo trasfondo metabólico puede ser afectado por el CPIB.

3.2.2. Efectos del CPIB sobre triglicéridos.

La figura 12 representa los niveles de triglicéridos a lo largo del desarrollo de *Ceratitis capitata* en insectos controles y tratados con CPIB a distintas concentraciones. Los controles poseen niveles entre 0.5 y 1.7 μ moles TG/mg lípidos totales en los distintos estadios del desarrollo.

La concentración de triglicéridos disminuye significativamente, a consecuencia de la administración de CPIB al 4% en la dieta larval, en larvas de 5 días y 7 días, farato-adulto de 7 días y adultos recién emergidos.

Cabe destacar la confirmación del efecto hipotrigliceridémico del CPIB bien conocido en mamíferos. A una concentración del 1% el efecto del CPIB no resulta, sin

embargo, significativo.

Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por Levinson (1973) para *Dytiscus*, tras la administración en la dieta larval del CPIB.

3.2.3. Efectos del CPIB sobre fosfolípidos totales.

Los efectos de distintas concentraciones del -- CPIB en los niveles de fosfolípidos totales de *Ceratitis capitata* durante el desarrollo se expresan en la figura - 13. Los controles poseen concentraciones que oscilan entre 0.3-0.4 μ moles/mg de lípidos totales en larva y farato-adulto, hasta más de 0.6 μ moles/mg de lípidos totales en el adulto recién emergido. ~~Estos niveles disminuyen~~ significativamente en el caso de concentraciones del 4% - de la droga a partir del estadio de farato-adulto de 2 -- días, alcanzando un 42% de reducción en el adulto recién emergido.

3.2.4. Efectos del CPIB sobre colesterol total.

La concentración de colesterol total a lo largo del desarrollo de *Ceratitis capitata* en insectos controles y tratados con distintos niveles de CPIB se -- manifiesta en la figura 14. Los controles poseen concentraciones oscilantes entre 0.7 y 1.4 μ moles/mg de lípidos totales en los distintos estadios del desarrollo. Estos

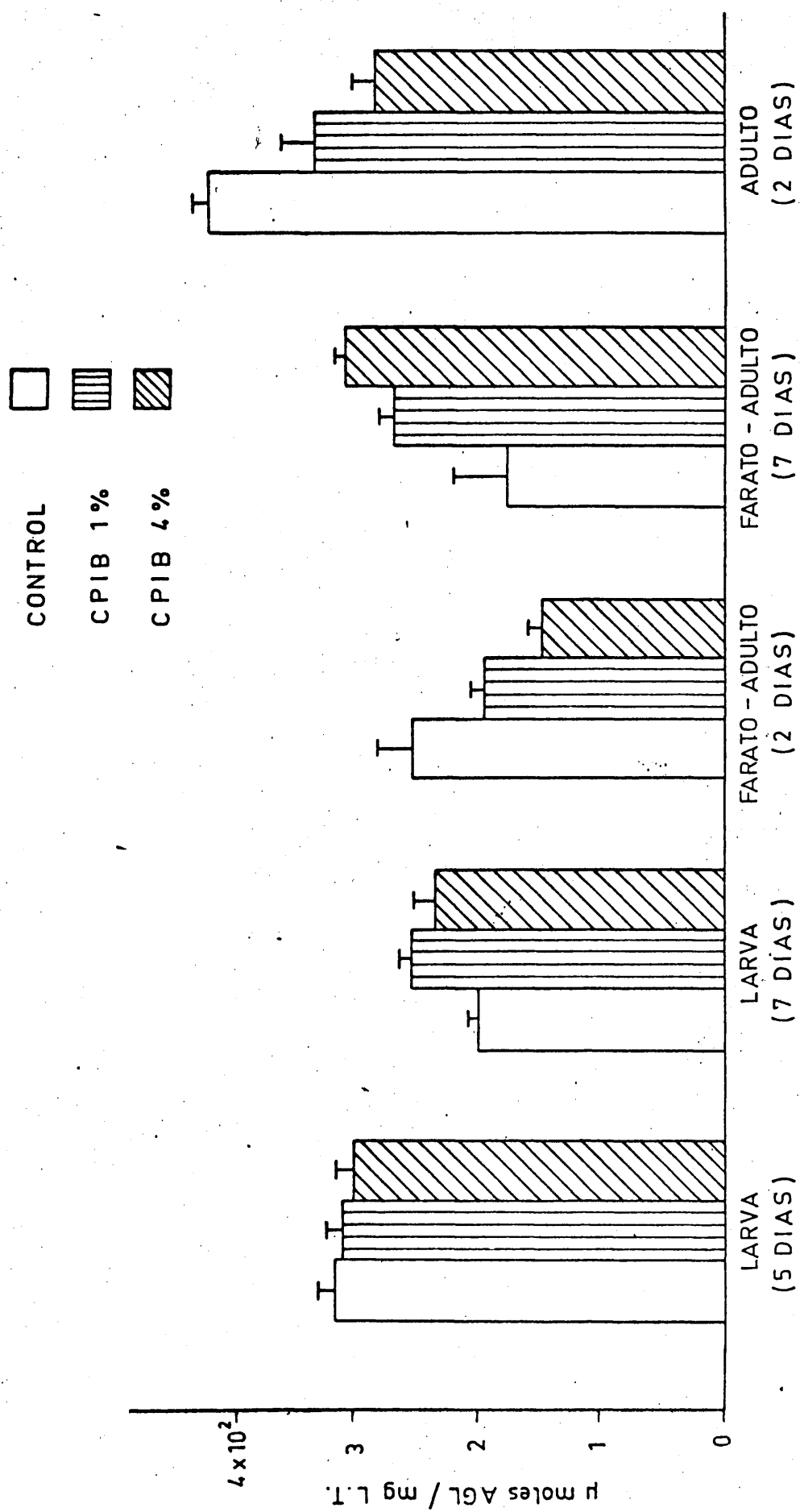
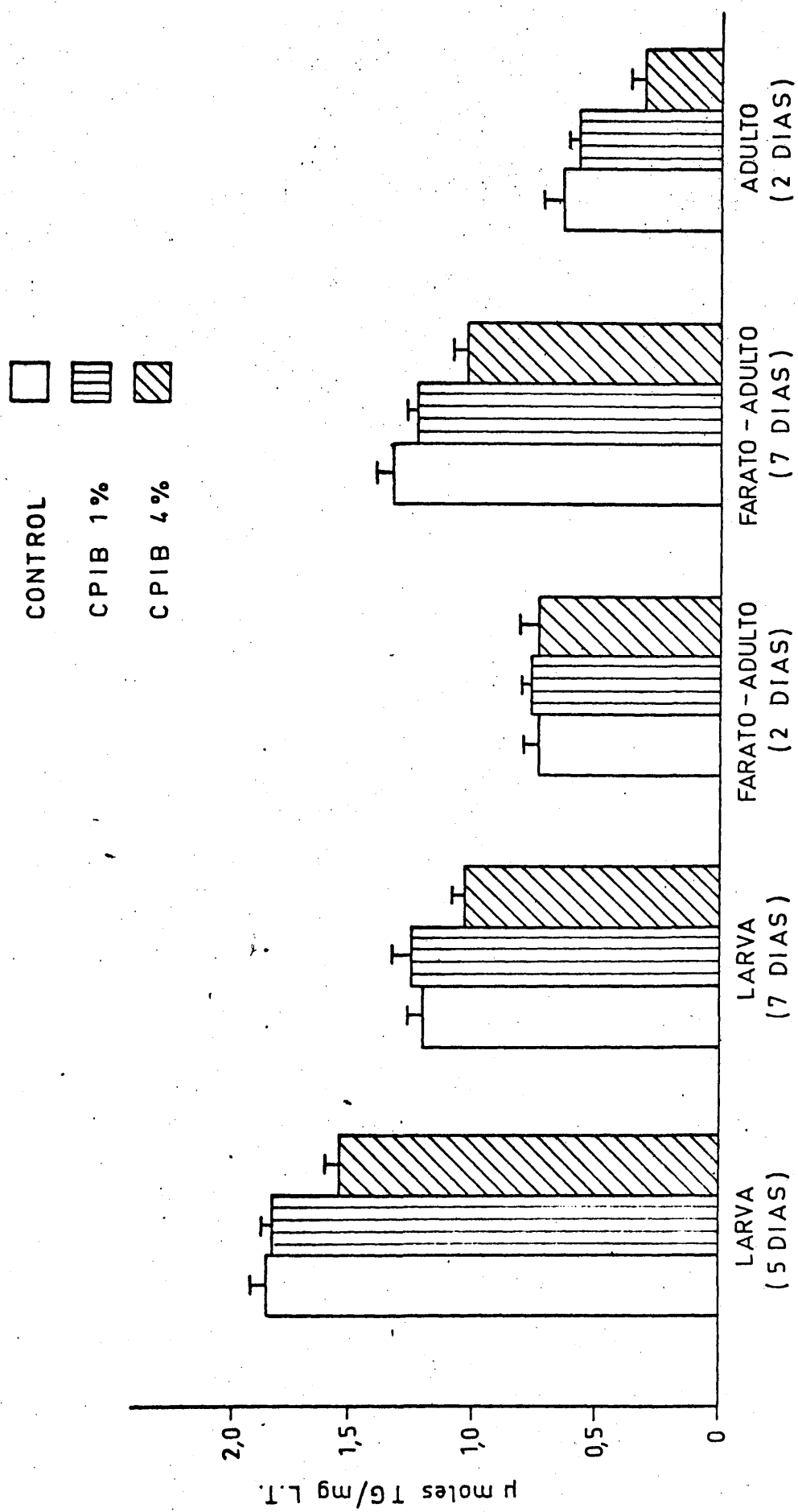


Figura 11.-

Figura 12.-



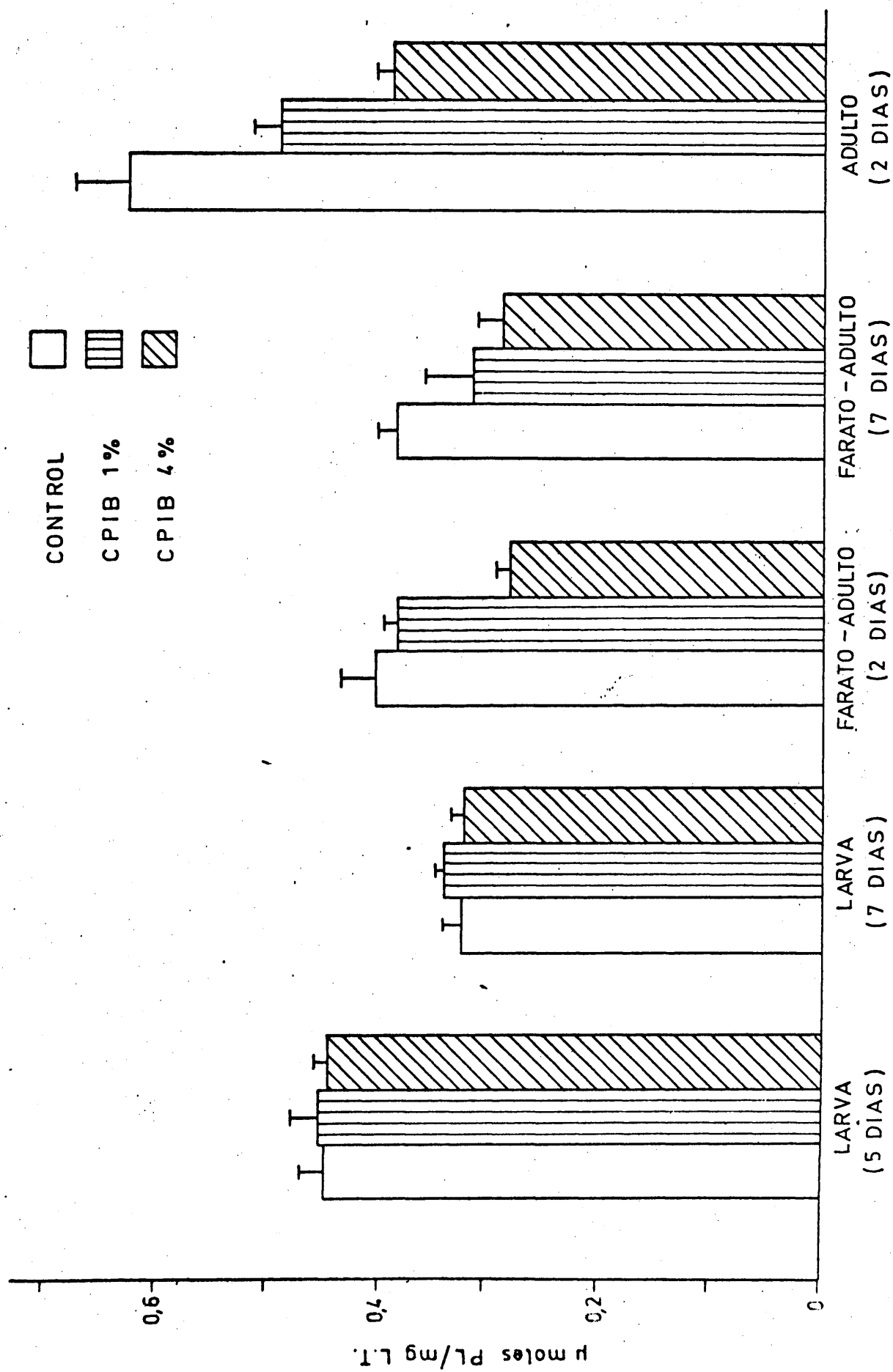


Figura 13.-

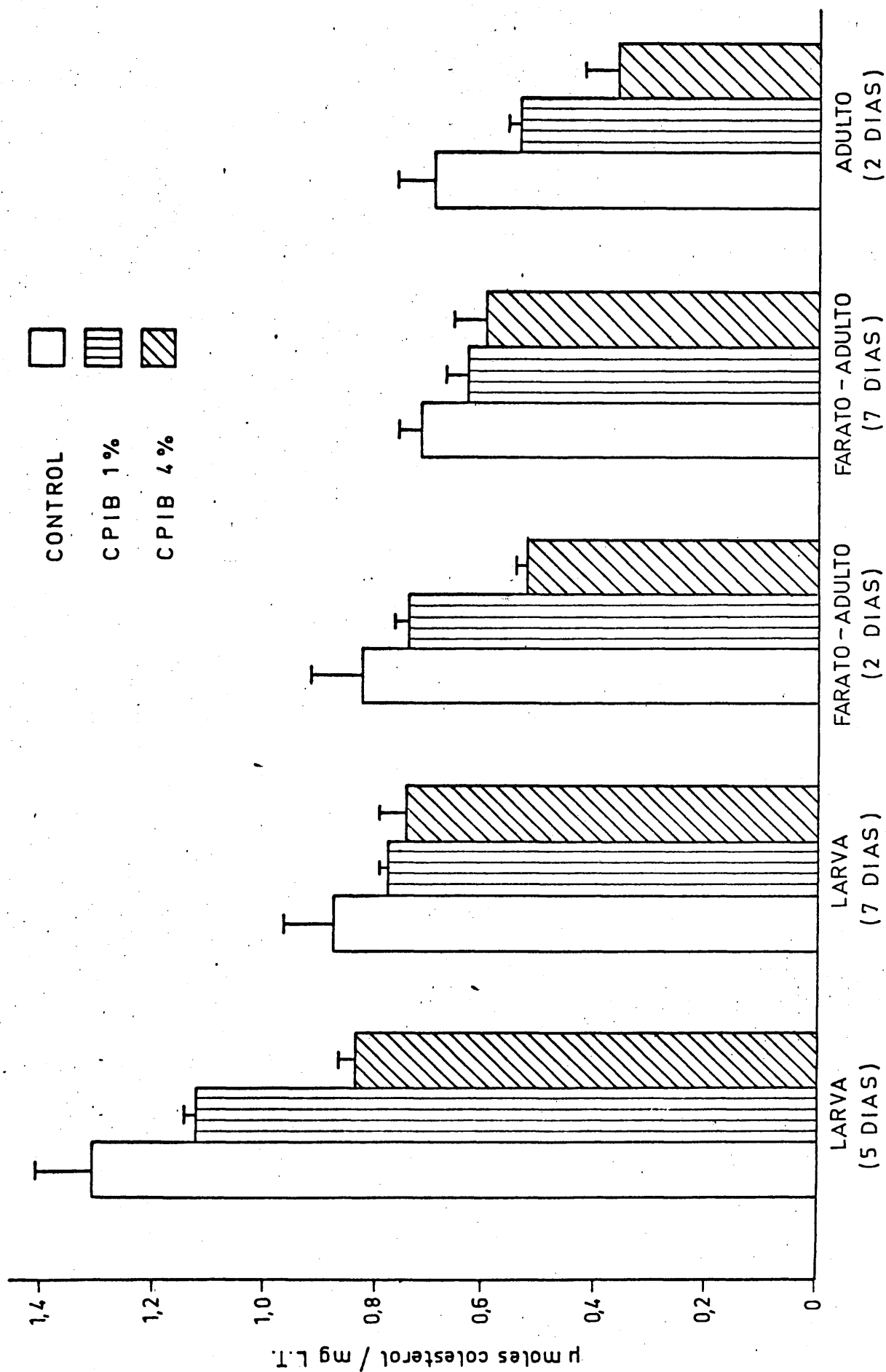


Figura 14.-

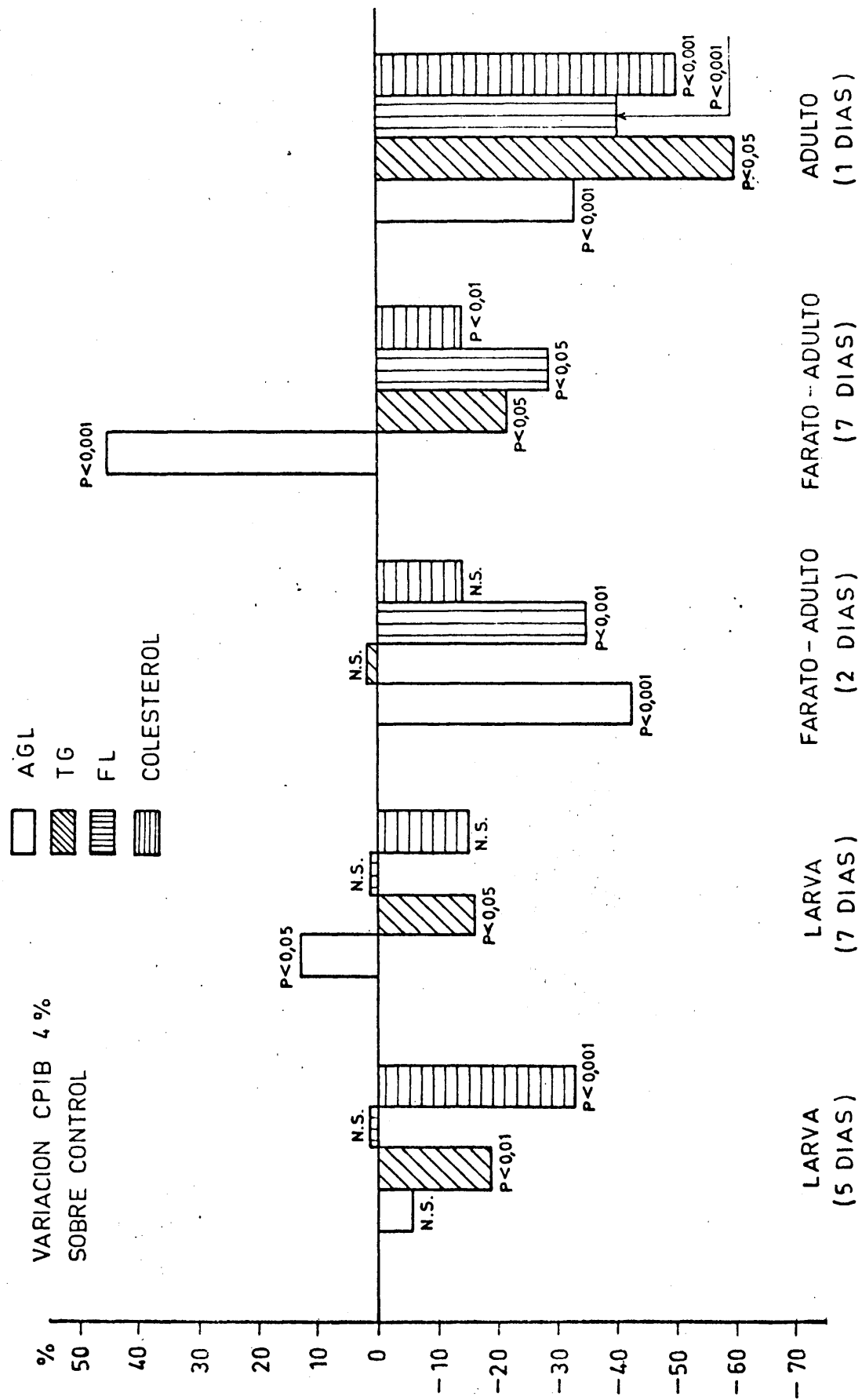


Figura 15.-

niveles disminuyen significativamente en la larva de 5 días, el farato-adulto de 2 días y el adulto recién emergido, a consecuencia de la administración de CPIB en la dieta larval. La reducción es mayor a medida que aumenta la concentración de la droga en la dieta.

* * *

En la figura 15 se resumen los datos obtenidos a lo largo del desarrollo de *Ceratitis capitata* de los efectos del CPIB al 4% en los niveles de distintas clases de lípidos como porcentajes de variación sobre insectos - controles.

En primer lugar, cabe destacar el efecto hipolipídémico del CPIB a lo largo del desarrollo. Este efecto es particularmente interesante en el caso de los triglicéridos y fosfolípidos.

Las diferencias metabólicas existentes a lo largo del desarrollo de *Ceratitis capitata*, conciernen principalmente al metabolismo de triglicéridos (cfr. Municio et al., 1975a), por lo que los efectos del CPIB sobre esta fracción lipídica revisten particular interés. Además, cabe destacar que el estadio larval, momento en que se administra el CPIB, se caracteriza por el almacenamiento de reservas lipídicas en su mayor parte en forma de triglicéridos, por lo que toda alteración del metabolismo de triglicéridos incidirá, de alguna manera, en el comporta-

miento normal de este estadio.

En segundo lugar, los fosfolípidos, como es sabido, juegan un papel preponderante en la formación de las membranas ecdisiales en la metamorfosis del insecto, por lo que las alteraciones del metabolismo de fosfolípidos incidirán, de un modo y otro, en el desarrollo del insecto. En este contexto hemos de interpretar el efecto hipolipidémico del CPIB, en relación con las alteraciones en el desarrollo de *Ceratitis capitata* reseñadas en el apartado 3.1.2. El efecto de retraso en la apolilisis larva-pupa, inducido por el CPIB, puede estar ocasionado por la reducción simultánea de la reserva lipídica del insecto durante el estadio larval. En este preciso momento, correspondiente a la larva de 7 días, tiene lugar una reducción significativa de la concentración de triglicéridos, acompañada de un incremento de los niveles de ácidos grasos libres, fenómeno que se repite únicamente en el momento de la emergencia del adulto. Este hecho presenta la posibilidad de un efecto, inducido por el CPIB, en los sistemas enzimáticos responsables de la conversión de triglicéridos en ácidos grasos libres y viceversa, o sea en la lipólisis y en la lipogénesis, precisamente en estos momentos cruciales para el desarrollo del insecto.

La posibilidad de la relación de efectos, inducidos por el CPIB, entre el desarrollo y el metabolismo lipídico, se apoya en la existencia de un mecanismo regu

lador del metabolismo lipídico de insectos a cargo del - complejo endocrino formado por el corpus cardiacum y corpus allatum que simultáneamente regulan el desarrollo del insecto (apartado 1.4.5.).

3.2.5. Efectos del CPIB sobre fosfolípidos individuales.

Los fosfolípidos totales se fraccionaron en sus - principales clases: fosfatidil-colina y su lisoderivado, - fosfatidil-etanolamina y su lisoderivado, y fosfatidil serina, y se determinaron sus concentraciones en insectos con-- troles y tratados con CPIB al 4%. Los resultados se mues-- tran en las figuras 16, 17 y 18.

Las fosfatidiletanolaminas, fosfolípidos mayoritarios en dípteros en general (Fast, 1966) y en *Ceratitis capitata* en particular (Castillón et al., 1972), disminuyen - en larvas de 7 días y adultos recién emergidos a consecuen-- cia del tratamiento con CPIB. Con respecto a las especies de fosfatidil-colina sucede algo similar, disminuyendo en - larvas y adultos sin experimentar variación en farato-adul-- tos. Los lisoderivados correspondientes a estas dos frac-- ciones muestran un comportamiento opuesto, observándose un supuesto equilibrio entre estas dos formas. En cuanto a - las especies de fosfatidilserina no son modificadas de modo significativo a lo largo del desarrollo.

El papel de las especies de fosfatidil-colina co-- mo promotoras del desarrollo es conocido en varias especies

de dípteros: *Aedes aegypti* y *Drosophyla melanogaster* -
(Golberg y DeMeillon, 1948; Grison, 1948; Sang, 1956, -
House, 1970), aunque no poseen efecto demostrable en *Mus*
ca domestica (Brookes y Fraenkel, 1958).

Estos efectos del CPIB son de gran importancia
dada la incidencia universal de los fosfolípidos en los
tejidos vivos y su papel en el transporte de sustancias
al interior a través de la membrana celular.

La correlación entre reducción de especies -
de fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina y el aumen -
to de sus plasmalógenos correspondientes puede supo- -
ner una acción del CPIB, directa o indirecta, sobre -
los sistemas enzimáticos de acilación y desacilación.
En todo caso, las especies de fosfatidil-serina permane-
cen inalterados por el CPIB a lo largo del desarrollo. El
posible papel de la fosfatidil-serina en el efecto del -
CPIB sobre el desarrollo del insecto será discutido más
adelante.

En el caso del farato-adulto, no se manifiesta
ninguna alteración significativa sobre los fosfolípidos
individuales correspondiendo a la paralización parcial -
de la actividad metabólica de fosfolípidos durante el es--
tadio del insecto. (cfr. Castillón et al., 1974).

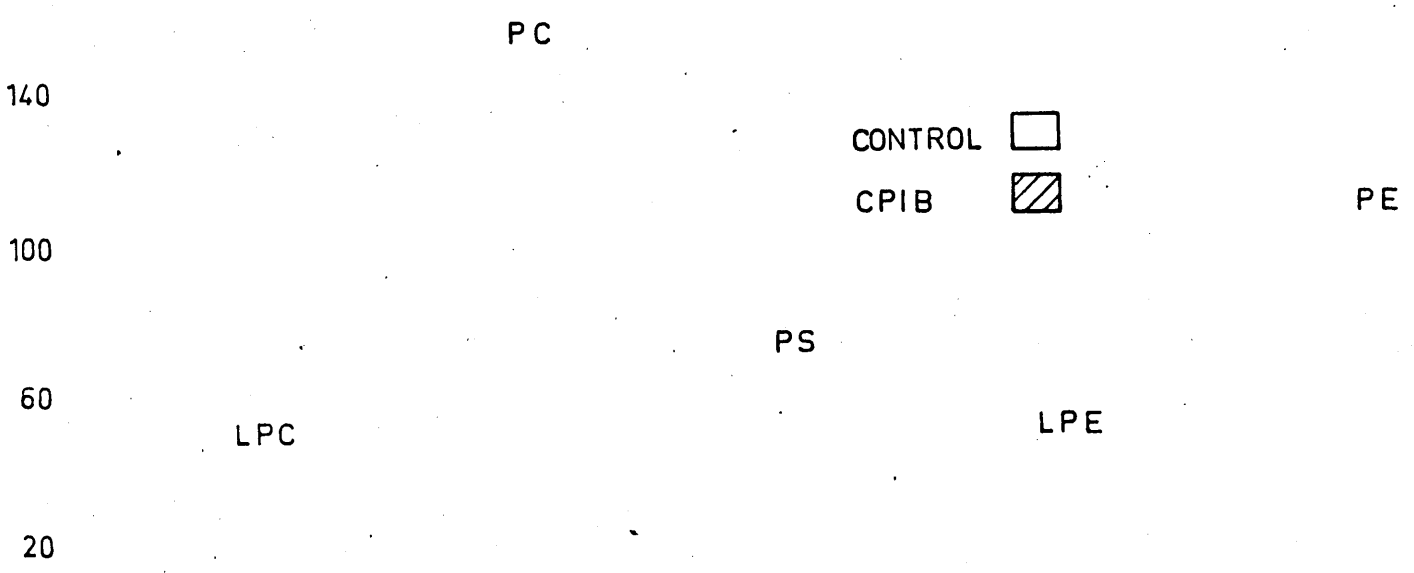


Figura 16.-

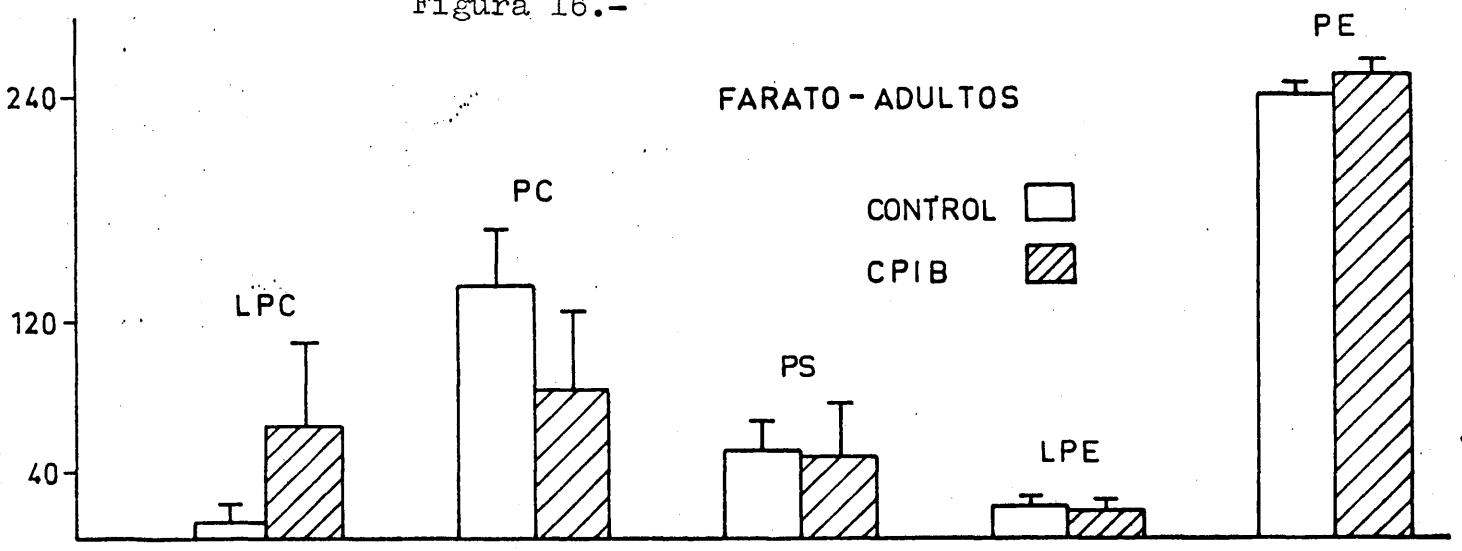


Figura 17.-

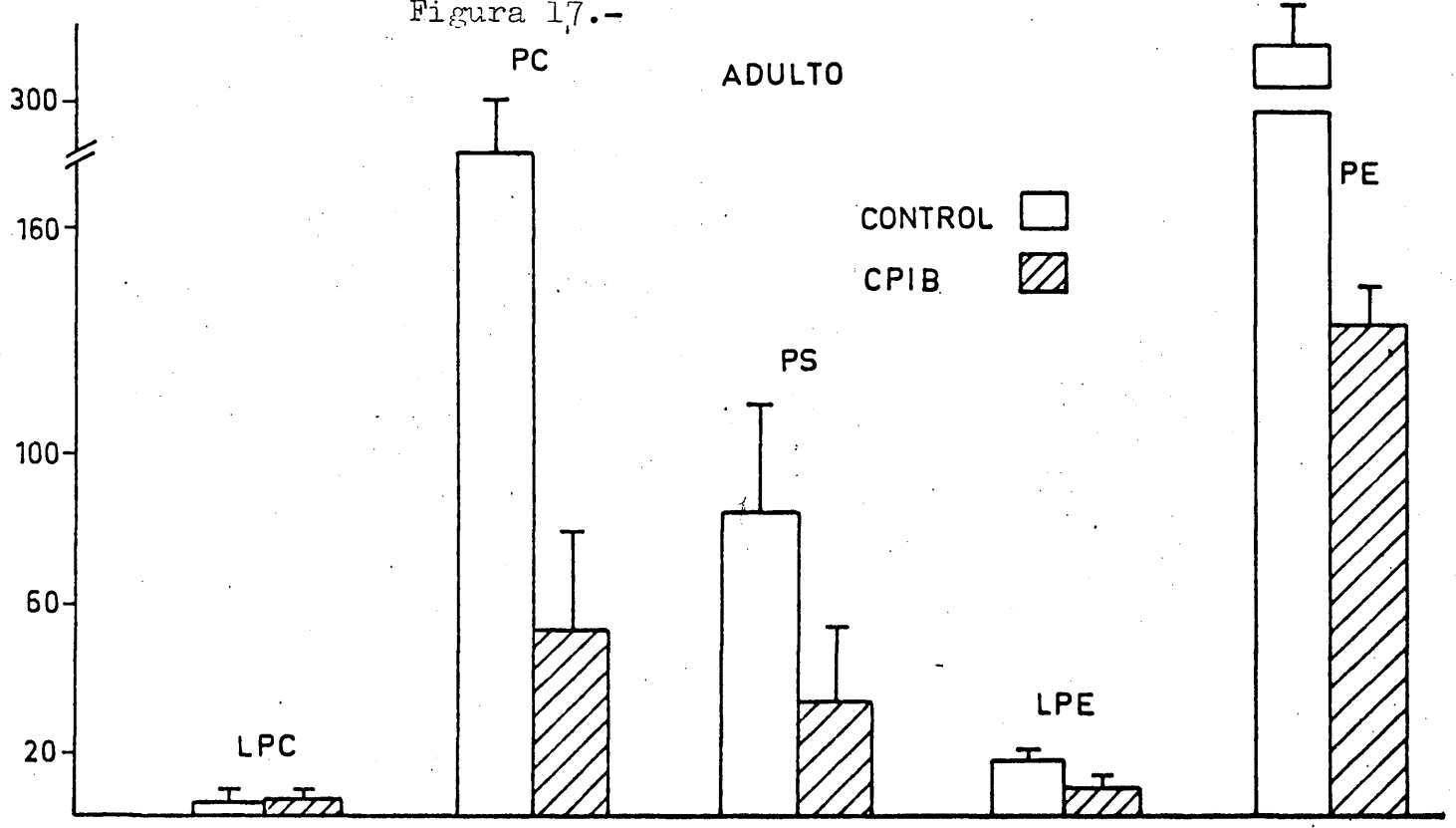


Figura 18.-

3.2.6. Efectos sobre la composición de ácidos grasos.

En la figura 19 se expresa el efecto inducido por el CPIB en la composición de ácidos grasos de LT a lo largo del desarrollo de *Ceratitis capitata*. Se observa, en el estadio de larva, un incremento del ácido palmítico (16:0) y del ácido esteárico (18:0), así como la reducción de los niveles de ácido palmitoleico (16:1), oleico (18:1) y linoleico (18:2). En el caso del farato-adulto, la acción del CPIB consiste en la reducción del ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0) y linoleico (18:2) y el incremento del ácido palmitoleico (16:1) y oleico (18:1).

Los insectos adultos recién emergidos fueron separados como machos y hembras y los efectos diferenciales se observan en la figura anterior como porcentajes de variación sobre los controles.

El ácido palmítico (16:0) experimenta una reducción que se contrapone al incremento que experimentan los ácidos insaturados oleico (18:1) y linoleico (18:2). La acción del CPIB, en este último caso, recae particularmente sobre los machos.

Los lípidos totales se fraccionaron en ácidos grasos libres, triglicéridos y fosfolípidos y se estudiaron las variaciones introducidas por el CPIB en la composición de ácidos grasos de las diversas clases de lípidos (figuras 20, 21 y 22).

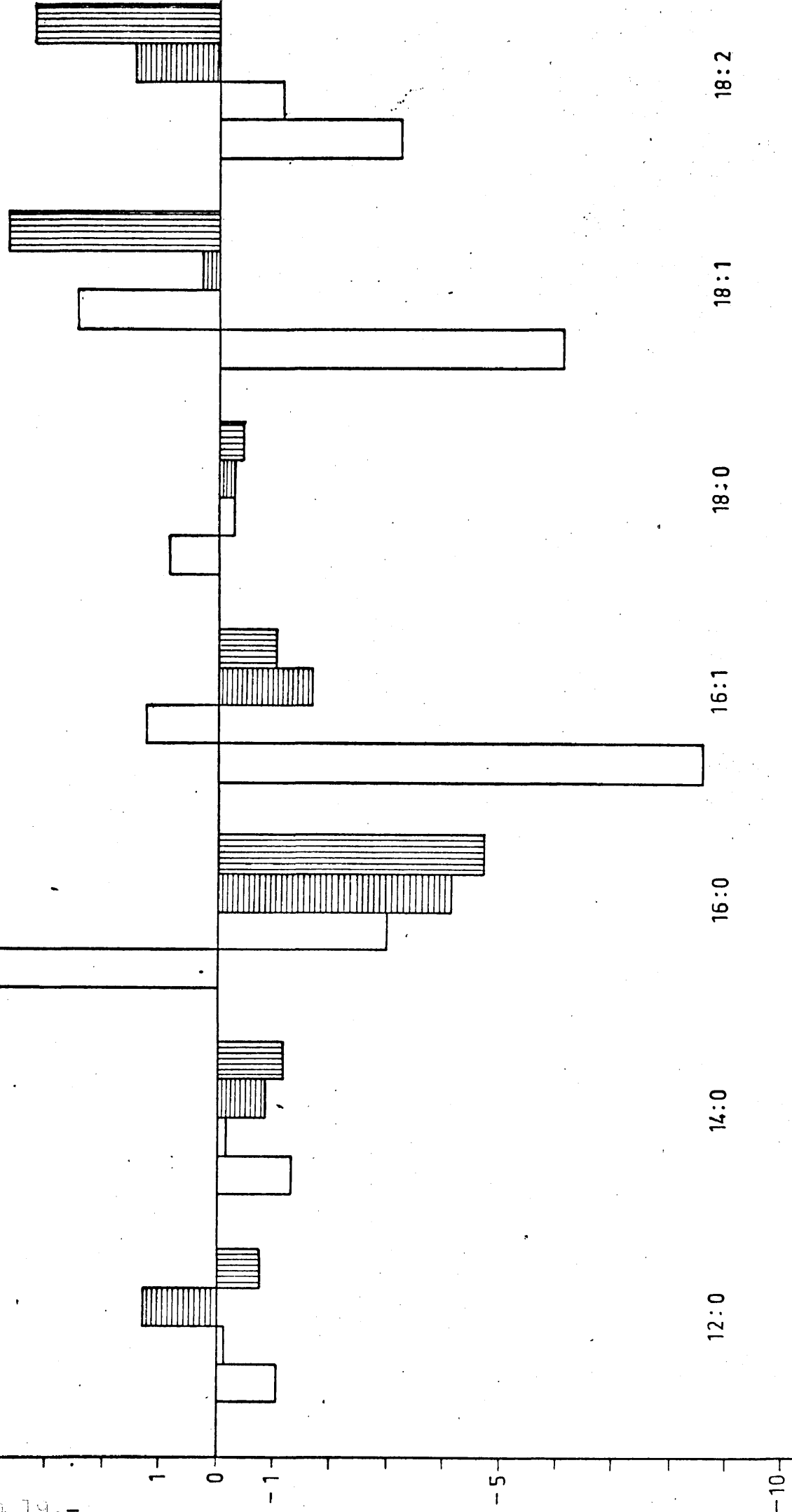
En la figura 20 se muestra el efecto del CPIB sobre la composición de ácidos grasos de la fracción correspondiente a ácidos grasos libres. El esquema es muy semejante al correspondiente a los lípidos totales durante los estadios de larva y farato-adulto. En la figura anterior se expresan, también, los resultados en machos y hembras procedentes de adultos recién emergidos. Los machos presentan un aumento de los niveles de ácido oleico (18:1) y linoleico (18:2). Las hembras, al contrario, exhiben un incremento de ácidos saturados como el láurico (12:0) y el palmítico (16:0).

La figura 21 muestra las variaciones en la composición de ácidos grasos de la fracción correspondiente a triglicéridos. En larva, el ácido oleico (18:1) y el palmitoleico (16:1) aumentan, y disminuye el ácido linoleico (18:2). En farato-adulto el incremento de ácido palmitoleico (16:1) y oleico (18:1) es aún mayor, al tiempo que disminuyen los ácidos saturados palmítico y esteárico (16:0 y 18:0). En la figura anterior se expresa la acción diferencial sobre machos y hembras del CPIB. En los machos continúa el incremento de ácido linoleico (18:2), palmítico (14:0) y ácido oleico (18:1). Los fosfolípidos del insecto su fren, también, en la composición de ácidos grasos, la acción del CPIB. En la figura 22 se muestra cómo van disminuyendo los ácidos saturados de la larva, mientras aumentan los insaturados. En el farato-adulto, -

LÍPIDOS TOTALES

LARVA
 FARATO - ADULTO
 ADULTO - HEMBRA
 ADULTO - MACHO

Figura 19.



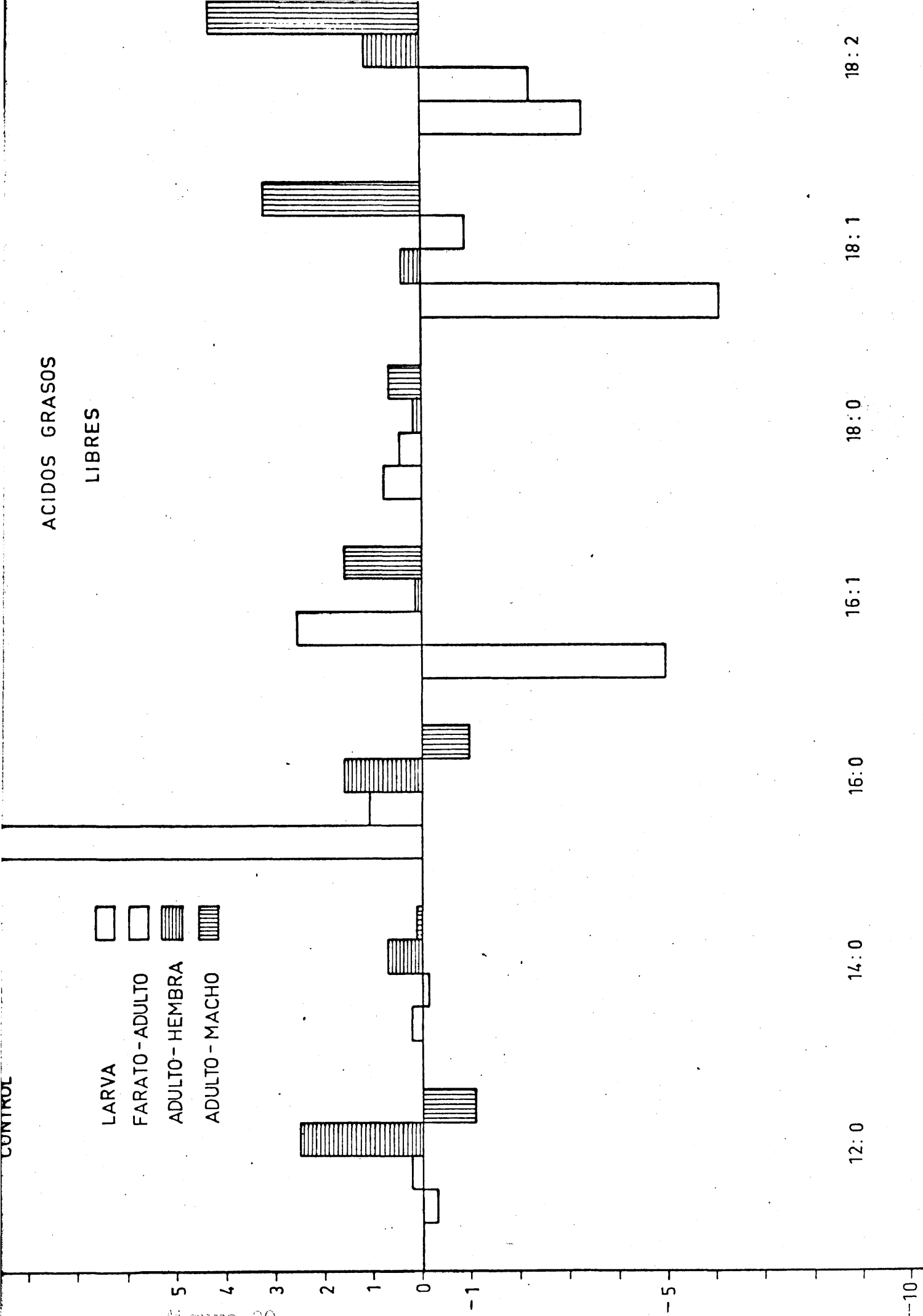


Figura 20.1

CONTROL

- LARVA
- FARATO-ADULTO
- ADULTO-HEMBRA
- ADULTO-MACHO

TRIGLICERIDOS

12:0 14:0 16:0 16:1 18:0 18:1 18:2

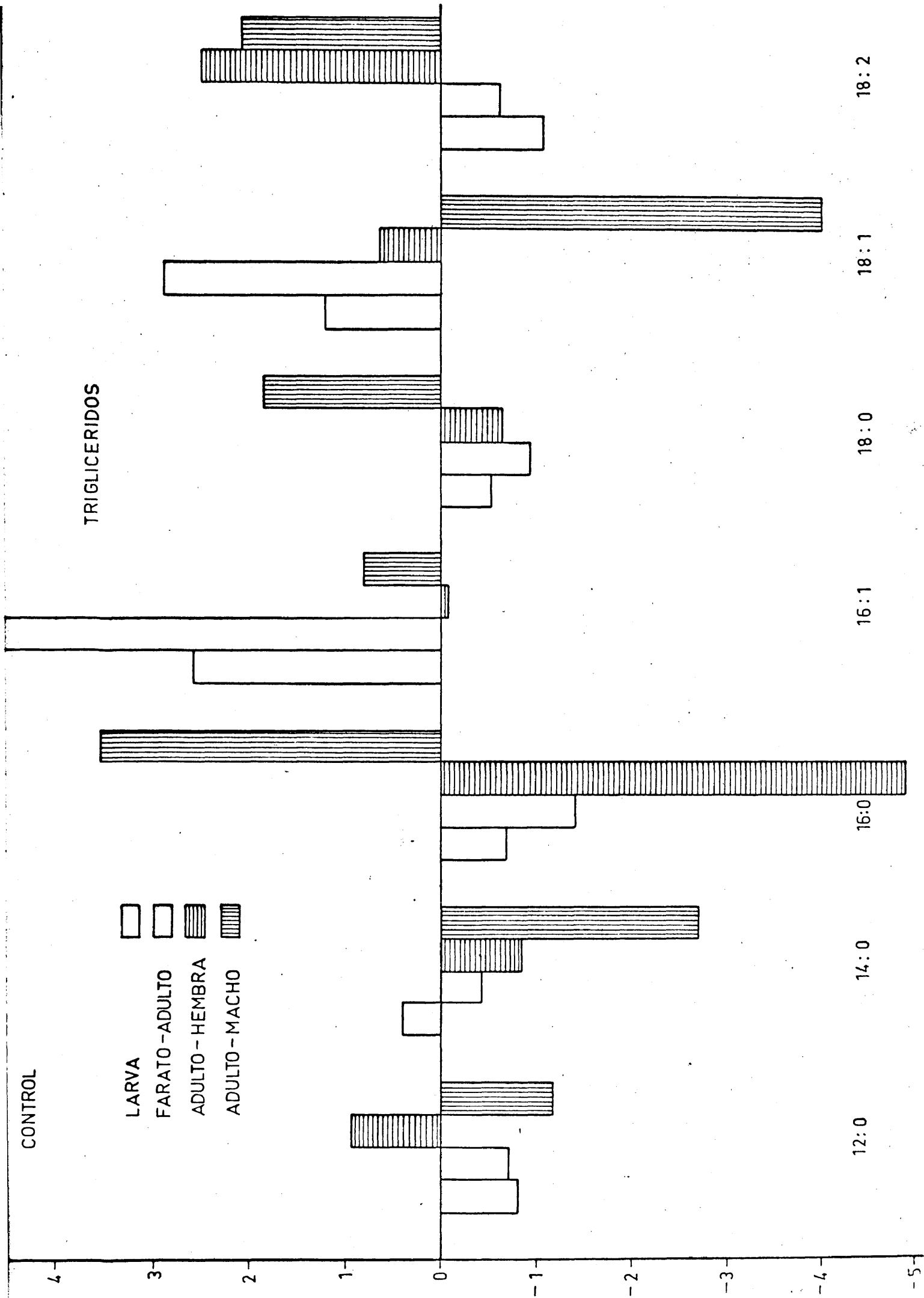


Figura 21.1

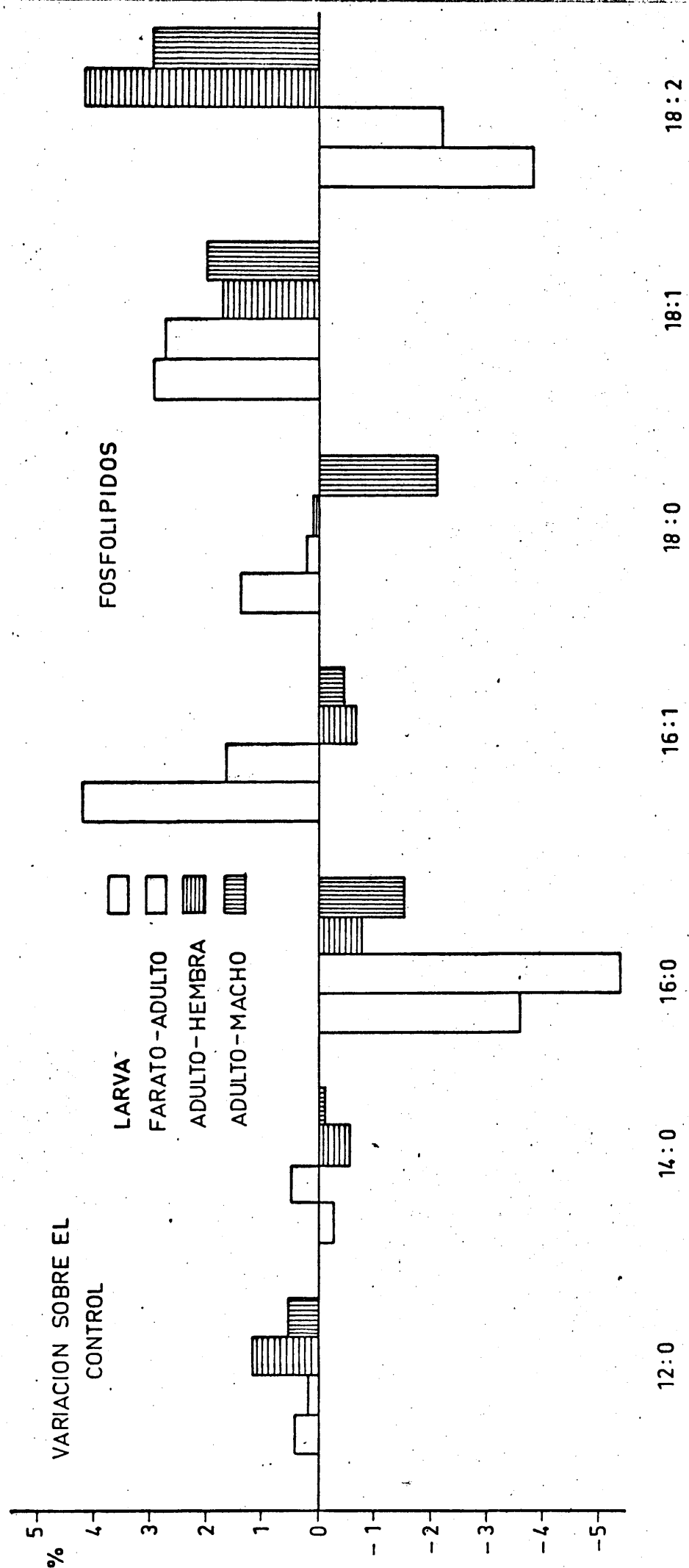


Figura 22.1

el esquema de acción es similar. La droga incide en la composición de los ácidos grasos de la fracción correspondiente a fosfolípidos de los adultos machos y hembras en el sentido de una disminución de los ácidos saturados palmítico y esteárico (16:0 y 18:0) de los machos, y un incremento de los ácidos oleico y linoleico (18:1 y 18:2). El modelo se repite en las hembras, aunque esta vez el incremento de ácido linoleico inducido por el CPIB es mayor.

En resumen, la fracción de ácidos grasos libres es responsable de los cambios en la concentración relativa de los ácidos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), oleico (18:1) y linoleico (18:2) en la larva. La fracción de triglicéridos es, por su parte, responsable de los cambios en los niveles de estos ácidos en el farato-adulto y en el adulto-hembra. Por último, la fracción de los fosfolípidos responde de las alteraciones de estos mismos ácidos grasos tanto en el farato-adulto como en adultos machos y hembras.

Estos cambios en la composición de ácidos grasos tienen una gran importancia debido a que la distribución relativa de ácidos grasos individuales en las tres clases de lípidos permanecen prácticamente invariables durante el desarrollo y son independientes de la dieta en la que ha crecido la larva (Mata, 1976). Con respecto al ácido oleico (18:1), que alcanza los valores más ele-

vados de todos los ácidos grasos de dipteros en todos los estadios (Barlow, 1964 ; Madariaga, 1970), disminuye a consecuencia del tratamiento con CPIB en los lípidos totales de larva, siendo responsable de esta alteración la fracción de ácidos grasos libres, mientras aumenta en el farato-adulto y adultos machos, respondiendo de esta alteración las fracciones de triglicéridos y fosfolípidos, y ácidos grasos libres y fosfolípidos, respectivamente.

Todos estos cambios en la composición de ácidos grasos se reflejan en los valores del grado de insaturación de la Tabla 1.

En el estadio de larva, el CPIB induce una disminución general del grado de insaturación.

Clases de lípidos	Lípidos Totales	Acidos Grasos	Triglicéridos	Fosfolípidos
Larva-Control	0,60	0,52	0,77	0,88
Larva-CPIB	0,40	0,37	0,54	0,86
Farato-adulto Control	0,58	0,68	0,51	0,52
Farato-adulto CPIB	0,61	0,61	0,56	0,87
Adulto-♀-Control	0,72	0,83	0,47	0,97
Adulto-♀-CPIB	0,78	0,85	0,53	1,07
Adulto-♂-Control	0,68	0,70	0,45	0,98
Adulto-♂-CPIB	0,79	0,83	0,47	1,07

Tabla 1.-Grado de insaturación (%) de ácidos grasos de lípidos totales, triglicéridos y fosfolípidos a lo largo del desarrollo de *Ceratitis capitata* en insectos-controles y en insectos -tratado con CPIB al 4% en la dieta larval.

Durante el estadio de farato-adulto no aparece variación significativa, debido a la ausencia de actividad de desaturasas en ese estadio (Municio et al., 1971 y 1972) sobre las que probablemente actúa el CPIB. En cuanto a los adultos, la variación inducida por el CPIB se manifiesta en los machos mediante un aumento generalizado del grado de insaturación.

Con respecto a los efectos del CPIB en la composición lipídica y de ácidos grasos de machos y hembras cabe destacar que pocos estudios sistemáticos se han realizado en insectos (Gilbert y Schneidermann, 1971; Van Handel y Lum, 1961; Kinsella, 1970; Yurkiewicz, 1970).

En el caso de *Ceratitis capitata*, son los machos los que poseen más lípidos totales (42,7 mg/g sobre 37,9 mg/g de las hembras), de acuerdo con los datos de Fast (1964) que señalan más contenido lipídico para los machos que para las hembras de especies de dípteros y lepidópteros, mientras que en los ortópteros (especialmente, familia Blattidae) son las hembras las que poseen más lípidos. Cuando fraccionamos los lípidos en sus distintas clases, observamos que las hembras poseen menos colesterol total (74 nmoles/mg LT sobre 83 nmoles/mg LT), menos fosfolípidos y menos triglicéridos que los machos, pero poseen más ácidos grasos libres.

Con respecto a la acción del CPIB, la disminución es especialmente notable en los glicéridos de los machos y las hembras, al tiempo que los ácidos grasos libres totales aumentan en ambos sexos. Las hembras poseen

más ácido linoleico (18:2) que los machos, a diferencia de otras especies (ej. ortópteros, Kinsella, 1970).

Levinson (1973) destaca la mayor susceptibilidad a cualquier variación de los ácidos palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1) de los insectos en la oógenesis y la reproducción, y Cohen (1972) señala también la importancia en la fertilidad de ácidos grasos de cadena corta. En las hembras de *Ceratitis capitata*, precisamente, existe una disminución de estos ácidos grasos, lo cual permite suponer un efecto del CPIB (apartado 3.1.4.) sobre la fecundidad de las hembras a través de la alteración selectiva del metabolismo de estos ácidos grasos.

Con respecto a la interpretación de la acción del CPIB sobre los AG de los machos hemos de señalar las diferencias con las hembras. En lípidos totales disminuyen los ácidos grasos saturados y aumentan los insaturados, especialmente el ácido linoleico (18:2). En la fracción de triglicéridos, sin embargo, aumentan los saturados y disminuye considerablemente el ácido oleico (18:1) a diferencia de las hembras, al tiempo que la reducción del ácido mirístico (14:0) es mayor que en aquellas. Esta selectividad de acción del CPIB sobre los machos y hembras ha sido demostrada también en mamíferos (cfr, Pantaleoni, 1974).

* * *

Debido a la escasez de datos sobre los efectos del CPIB en la composición de ácidos grasos en mamíferos, hemos afrontado el estudio, en homogeneizados de hígado - de ratas tratadas con CPIB en la dieta, de la composición y distribución de ácidos grasos en las distintas clases - de lípidos, de este modo podremos contemplar la discu- - sión de los resultados en el metabolismo de los AG de Ce ratitis capitata, a nivel comparativo. Los resultados - se expresan en la tabla 2.

En lípidos totales de hígado de rata se observa un aumento, inducido por CPIB, significativo del ácido - palmitico (16:0) y araquidónico (20:4) y una disminución también significativa del ácido linoleico (18:2), de acuerdo con los datos obtenidos por Cenedella (1968) y Maier - (1975).

En la fracción de lípidos correspondiente a los ácidos grasos libres se observa un incremento, inducido - por el CPIB, de los ácidos palmitico (16:0), palmitoleico (16:1) y araquidónico (20:4) y disminuye significativamente el ácido linoleico (18:2). En los triglicéridos es manifiesto el incremento del ácido palmítico (16:0), palmito--leico (16:1) y oleico (18:1), mientras se hace patente el - porcentaje menor de ácidos esteárico (18:0) y linoleico - (18:2). En la fracción correspondiente a los fosfolípidos, se exhibe aumento de ácidos palmítico (16:0) y palmito- - leico (16:1) y disminución de ácido linoleico (18:2).

El efecto del CPIB sobre la composición y distribución relativa de los ácidos grasos resulta muy simi--

Ácidos Grasos	Lípidos totales		Ácidos grasos libres		Triglicéridos		Fosfolípidos	
	CONTROL	CPIB	CONTROL	CPIB	CONTROL	CPIB	CONTROL	CPIB
14:0	0,61 ±0,26	0,68 ±0,10	2,09 ±0,61	1,85 ±0,40	-	-	-	-
16:0	23,92 ±1,94	26,99 ±0,65*	25,10 ±0,64	29,56 ±1,46*	32,95 ±0,07	38,45 ±1,11*	26,56 ±0,53*	34,86 ±1,74*
16:1	2,79 ±0,77	2,32 ±0,42	4,56 ±0,63	6,08 ±0,15*	4,98 ±0,57	5,40 ±2,17	0,68 ±0,15	1,10 ±0,23*
18:0	15,71 ±0,64	15,40 ±0,20	12,30 ±1,45	11,08 ±1,70	3,84 ±0,03	2,85 ±0,62*	37,78 ±1,62	32,75 ±2,11
18:1	10,09 ±2,40	11,79 ±0,92	17,89 ±1,76	14,62 ±1,06	24,20 ±3,71	30,29 ±2,52*	4,33 ±1,42	4,61 ±1,28
18:2	18,16 ±1,52	14,56 ±1,53*	20,46 ±1,37	14,84 ±1,15*	25,27 ±1,37	22,56 ±0,84*	6,42 ±1,70	6,35 ±0,61
20:4	18,11 ±1,19	23,49 ±2,00*	15,53 ±0,32	17,42 ±0,21*	4,59 ±0,26	4,77 ±0,97	17,68 ±2,39	14,79 ±0,61*
22:6	3,35 ±1,13	4,57 ±0,63	-	-	-	-	2,98 ±0,85	2,88 ±0,91

Tabla 2.- Composición (%) de ácidos grasos correspondientes a homogeneizados de hígado de ratas tratadas con CPIB en la

dieta, y de ratas controles, en lípidos totales y en diversas clases de lípidos. Cada valor representa la media de diez animales y su desviación estandar. La significación de los datos se ha realizado por el test t de Studen. * $P < 0.05$.

lar en ratas y larvas de *Ceratitis capitata*, en el sentido de un incremento del ácido palmítico (16:0) y una disminución del ácido linoleico (18:2). Además, existe en ratas y en *Ceratitis capitata* un similar aumento del grado de insaturación ocasionado por el CPIB.

Este aumento del ácido palmítico, en uno y otro caso, puede significar la inhibición, por el CPIB, de los mecanismos enzimáticos de elongación de cadena de este ácido, demostrada en hígado de rata por Quagliariello (1974) y Landriscina (1975), o bien por inhibición, inducida por el CPIB, de la palmitoil-CoA-desacilasa demostrada en hígado de rata por Capuzzi et al. (1974). De este modo, el ácido palmítico sufriría un desplazamiento de su metabolismo o bien por incremento de su oxidación, o bien por aumento de su incorporación a distintas fracciones lipídicas. Esta última posibilidad parece reflejada a lo largo del desarrollo del insecto puesto que los niveles de ácido palmítico disminuyen en lípidos totales al tiempo que aumenta su incorporación a triglicéridos.

Además, existe un catabolismo incrementado que debe contribuir a la reducción de los niveles del ácido linoleico tanto en ratas como en larvas y farato-adultos de *Ceratitis capitata* a consecuencia de la acción de la droga, posiblemente como un mecanismo compensatorio del bloqueo del metabolismo del ácido palmítico, favoreciendo la oxidación y el intercambio con otros ácidos grasos. Esta hipótesis se refleja en el caso de la fracción de triglicéridos de hígado de rata y larvas de *Ceratitis ca-*

pitata donde al tiempo que el ácido esteárico (18:0) disminuye, a consecuencia de la inhibición del metabolismo del ácido palmitico, los ácidos palmitoleico (16:1) y oleico (18:1), ambos monoinsaturados aumentan a expensas de la disminución del ácido linoleico (18:2). En el caso de ratas, también el aumento de ácido araquidónico, que se biosintetiza a partir de ácido linoleico (18:2) puede explicarse a partir del incremento del catabolismo de este ácido graso.

A la vista de estos resultados, podemos afirmar, en líneas generales, la acción selectiva del CPIB sobre los mecanismos de acilación y desacilación y sobre los sistemas enzimáticos de desaturación que regulan la interconversión de ácidos grasos de una y otra fracción lipídica.

Por otro lado, las importantes alteraciones, inducidas por el CPIB, en las concentraciones de ácidos grasos libres totales a lo largo del desarrollo de Ceratitis capitata, no pueden explicarse únicamente por medio de los mecanismos de interconversión de ácidos grasos, sino que probablemente implican alteraciones de la biosíntesis "de novo" de los mismos.

Por último, estos efectos del CPIB sobre la composición de ácidos grasos es posible que estén relacionados con la interferencia del CPIB en la apolisis larva-pupa (apartado 3.1.2.), puesto que los ácidos grasos en general, y el ácido linoleico (18:2) en particular,

juegan un papel importante en el crecimiento larval y la emergencia del adulto (House y Barlow, 1960).

3.2.7. Efectos del CPIB en la incorporación de acetato-1-¹⁴C.

En una segunda fase de la investigación en el metabolismo lipídico se llevó a cabo un estudio de los efectos del CPIB sobre la capacidad biosintética de homogeneizados del insecto en distintos estadios del desarrollo a partir de diferentes sustratos radiactivos.

A tal efecto se realizaron incubaciones "in vitro" a partir de acetato-1-¹⁴C a lo largo de dos horas utilizando homogeneizados procedentes de distintos estadios del desarrollo (larvas 7 días, farato-adultos 6 días y adultos recién emergidos tanto machos como hembras). Los resultados de la incorporación del acetato-1-¹⁴C a lípidos totales se exhiben en la figura 23 (A,B,C y D).

La incorporación experimenta un incremento, inducido por el CPIB, en larva y adulto (machos y hembras) y prácticamente se mantiene inalterada en el farato-adulto. Los perfiles de incorporación son muy semejantes para insectos controles y tratados con CPIB, exceptuada la larva que manifiesta, a las dos horas de incubación, un aumento muy superior de incorporación al del resto de los estadios.

La radiactividad específica de distintas cla -

ses de lípidos a lo largo del desarrollo a partir de acetato-1-¹⁴C en insectos controles y tratados con CPIB se exhibe en las figuras 24-27. En larvas, los perfiles de incorporación correspondientes a fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos libres experimentan un incremento como consecuencia del tratamiento con CPIB. Este incremento es especialmente acusado en el caso de los ácidos grasos libres. En farato-adulto, no se manifiesta alteración alguna en fosfolípidos mientras los perfiles de incorporación correspondientes a triglicéridos y ácidos grasos libres experimentan una correlación inversa.

El efecto del CPIB sobre los perfiles de incorporación, correspondientes a los adultos, se manifiesta en un incremento de los fosfolípidos y los ácidos grasos libres, mientras los triglicéridos muestran una más lenta incorporación que resulta inalterada con respecto al control a tiempo final de incubación.

El examen de los perfiles de incorporación correspondientes a adultos machos y hembras controles manifiestan un incremento por parte de las hembras de fosfolípidos, mientras los correspondientes a ácidos grasos y triglicéridos son idénticos. Estos perfiles de incorporación son alterados por el tratamiento con CPIB en el sentido de un incremento en las distintas clases de lípidos, y además, en el caso de fosfolípidos, no se manifiesta el efecto diferencial del CPIB observado en insectos controles, a tiempo final de incubación.

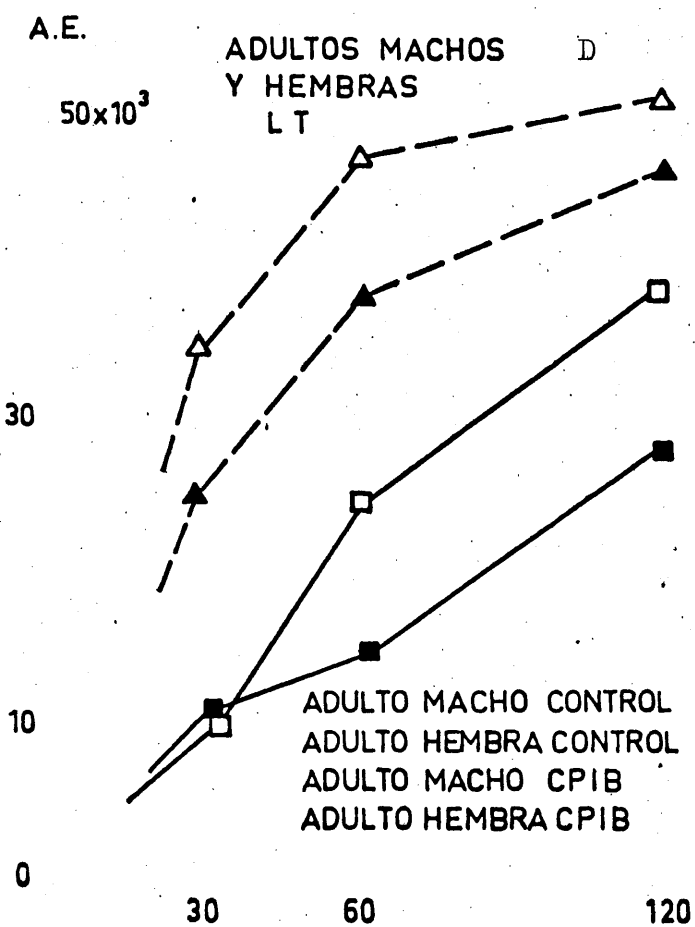
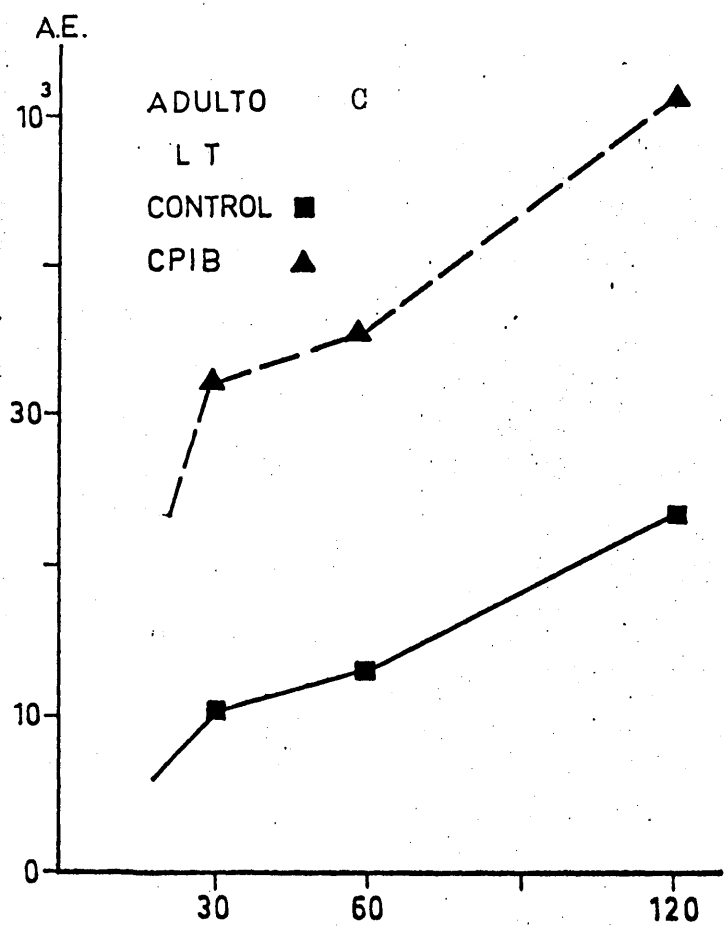
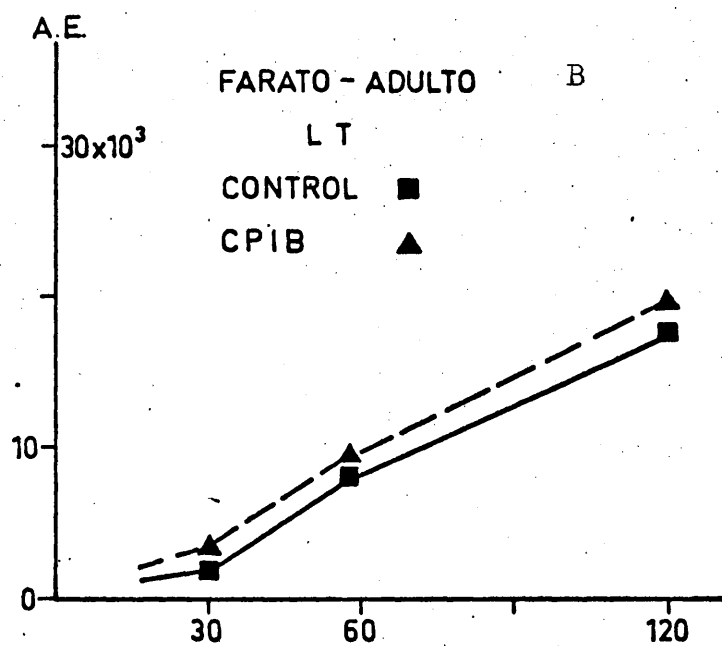
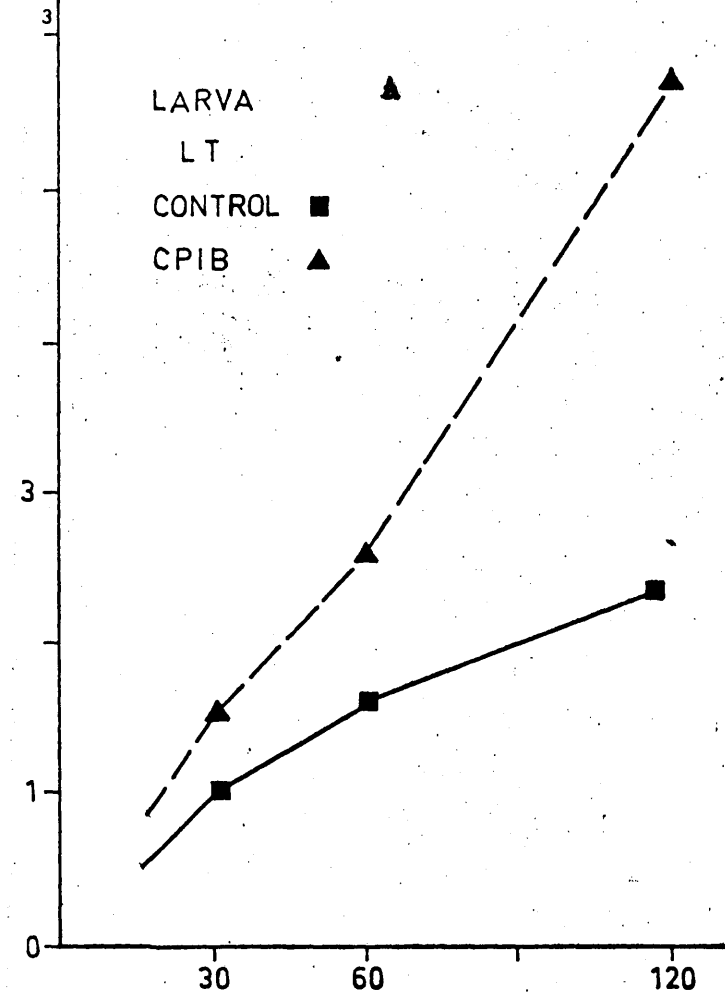


Figura 23.-

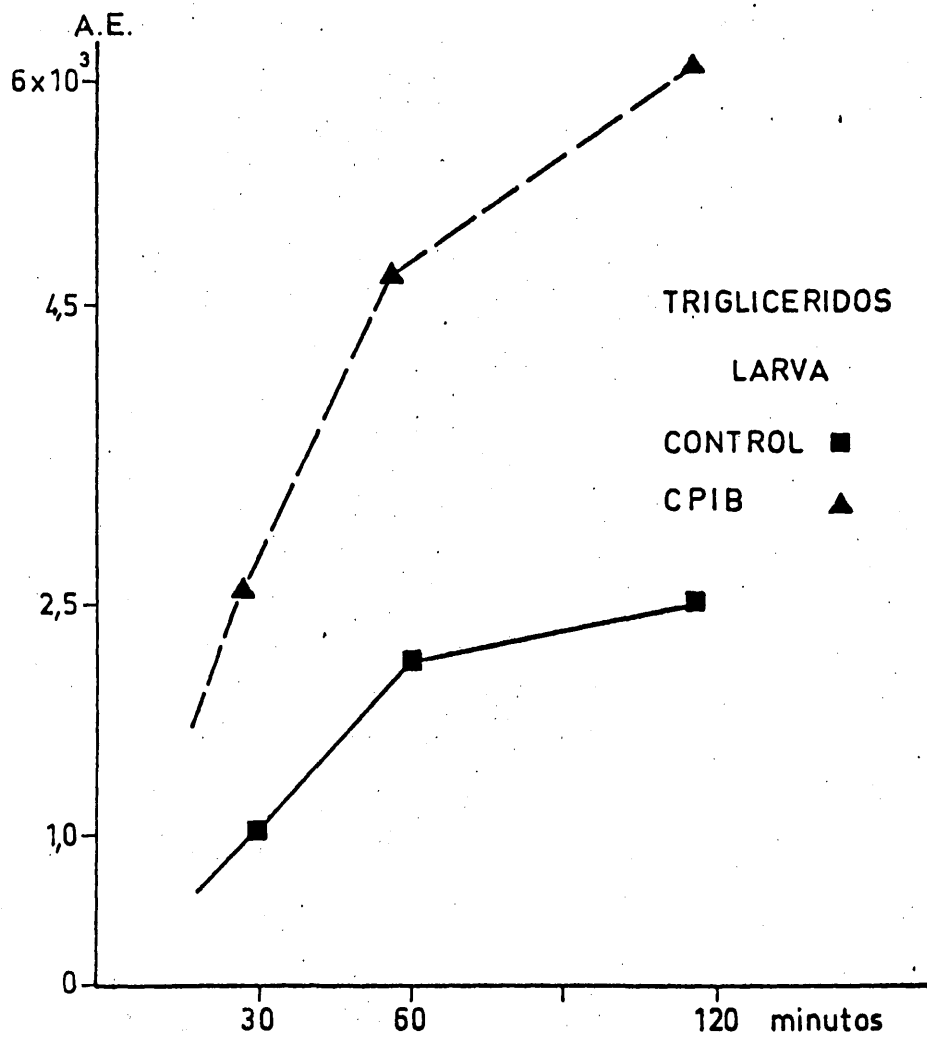
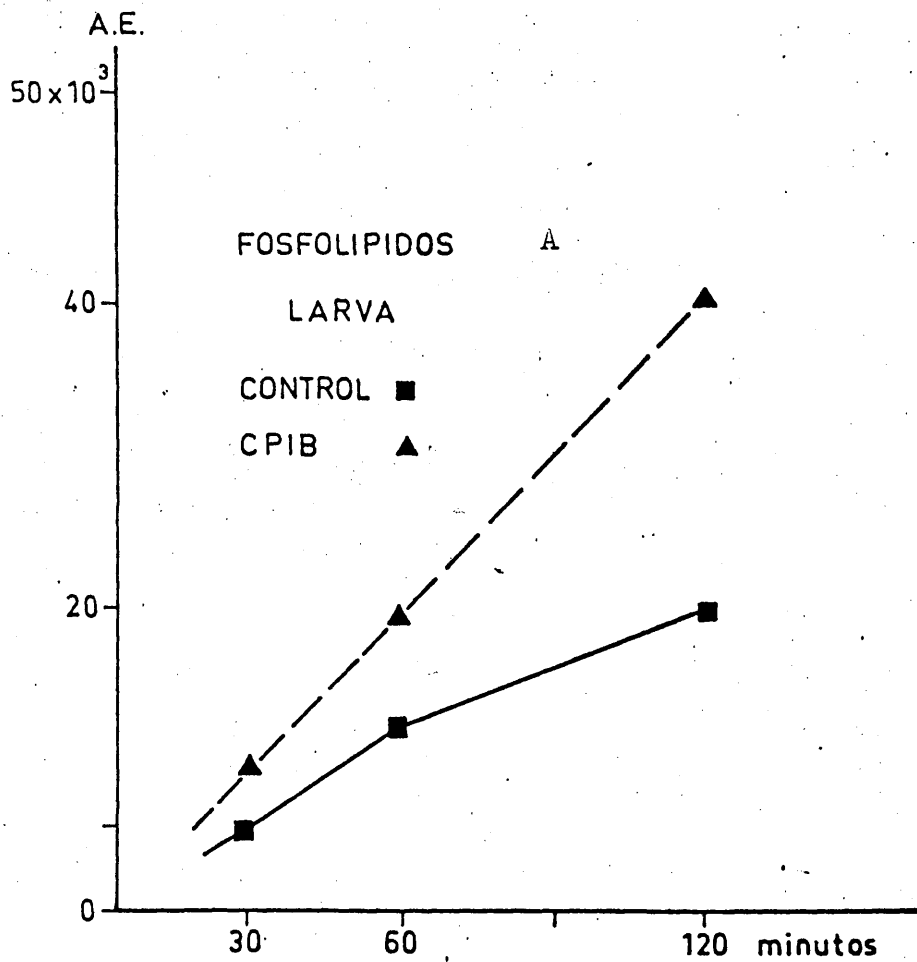


Figura 24.-

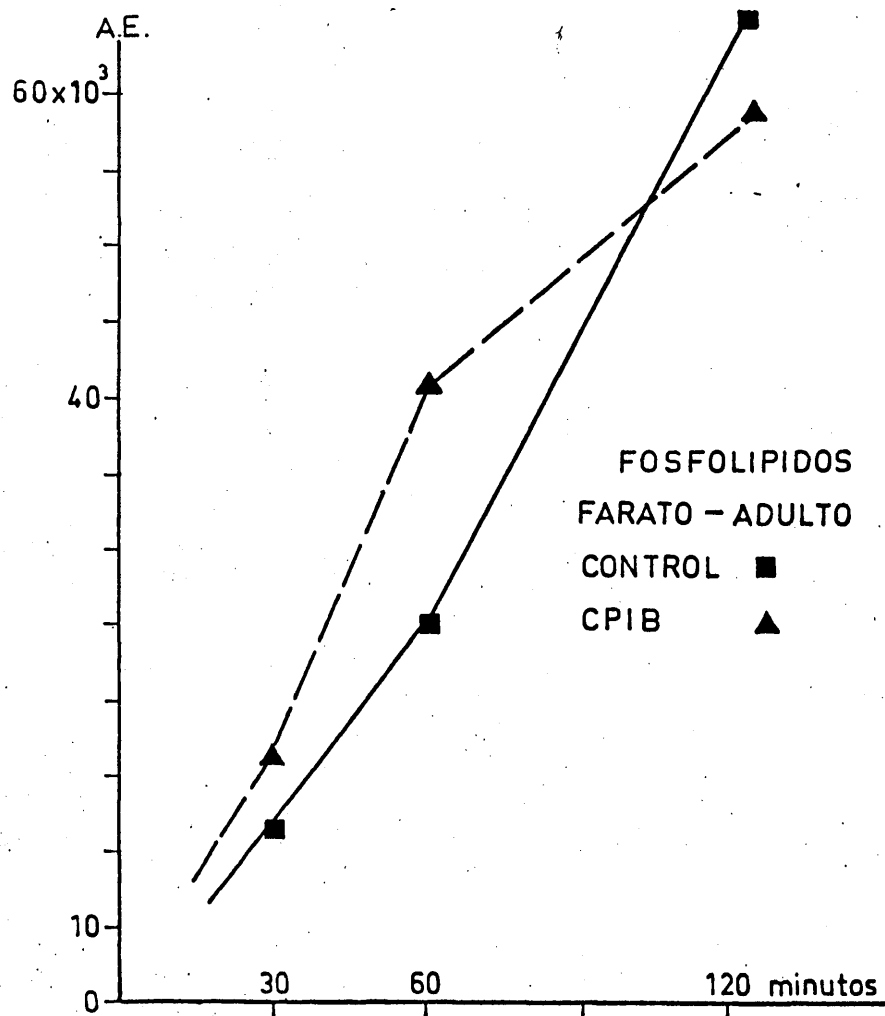
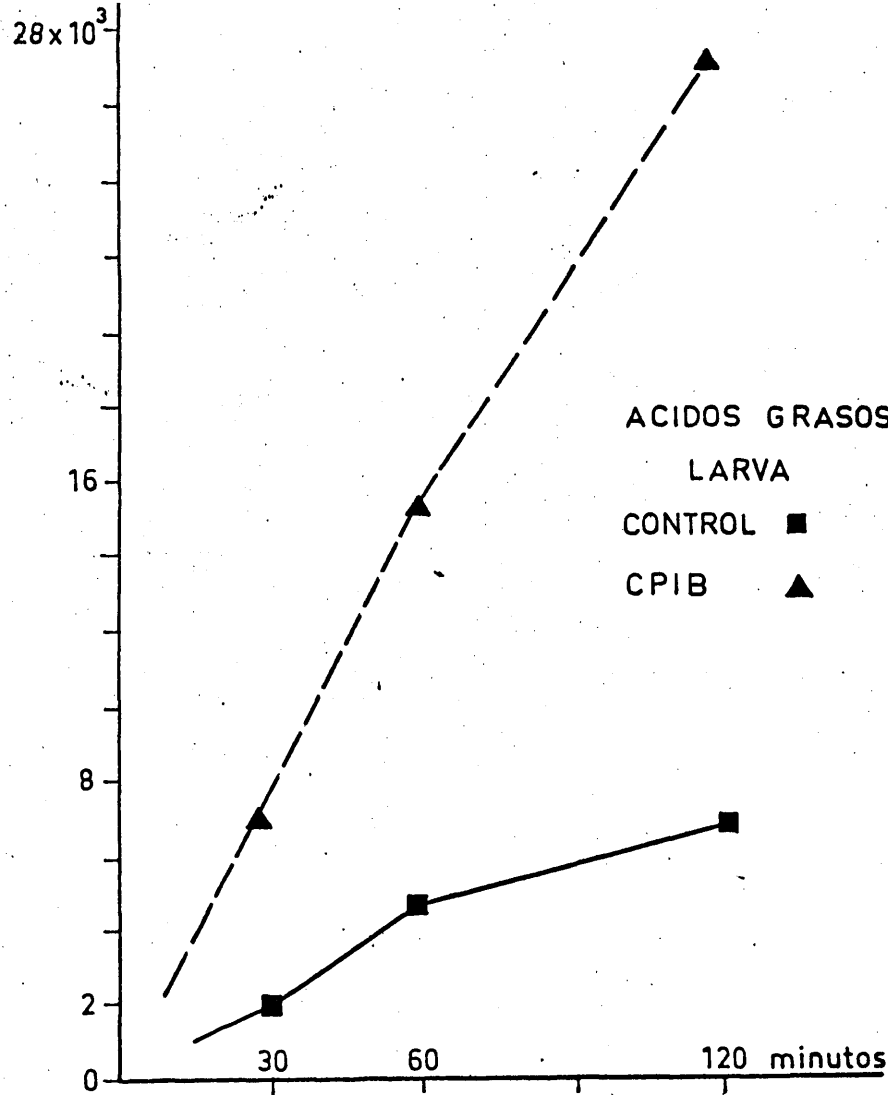


Figura 25.-

A.E.
 $6,5 \times 10^3$

4,0

TRIGLICERIDOS
FARATO-ADULTO
CONTROL ■
CPIB ▲

B

1,0

30

60

120 minutos

A.E.

30×10^3

20

10

5

30

60

120 minutos

ACIDOS GRASOS
FARATO-ADULTO
CONTROL ■
CPIB ▲

C

Figura 26.-

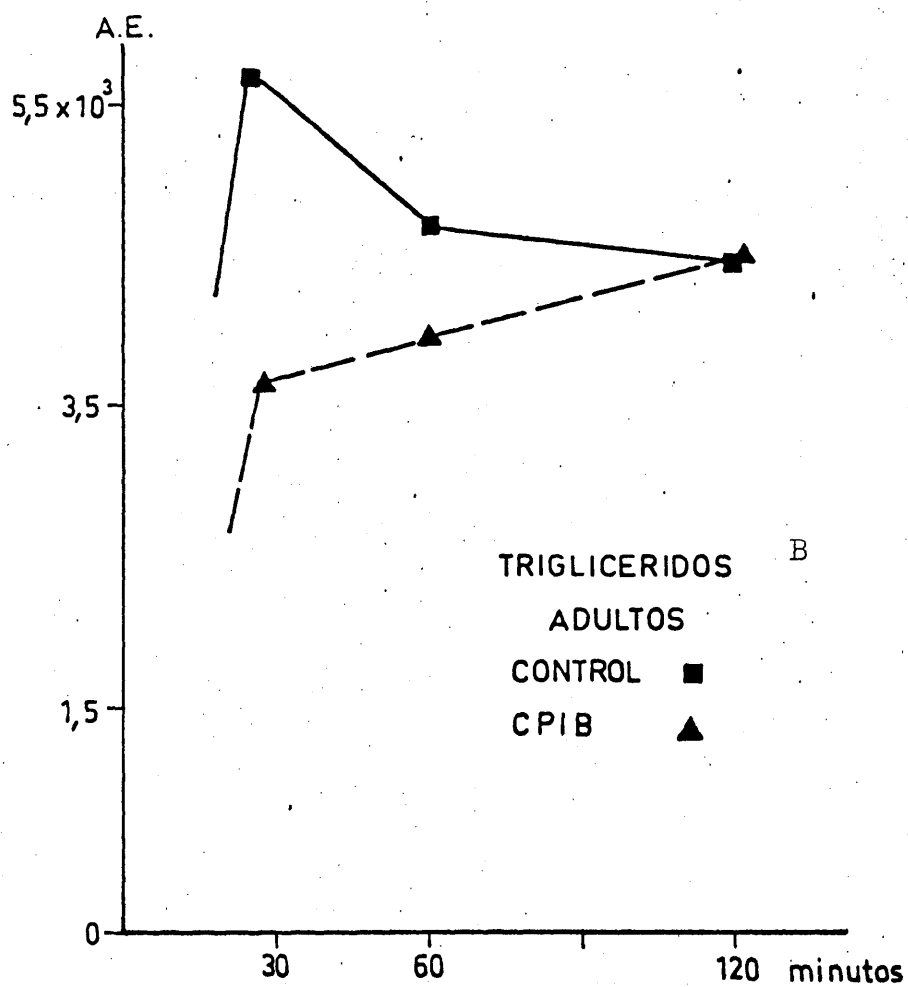
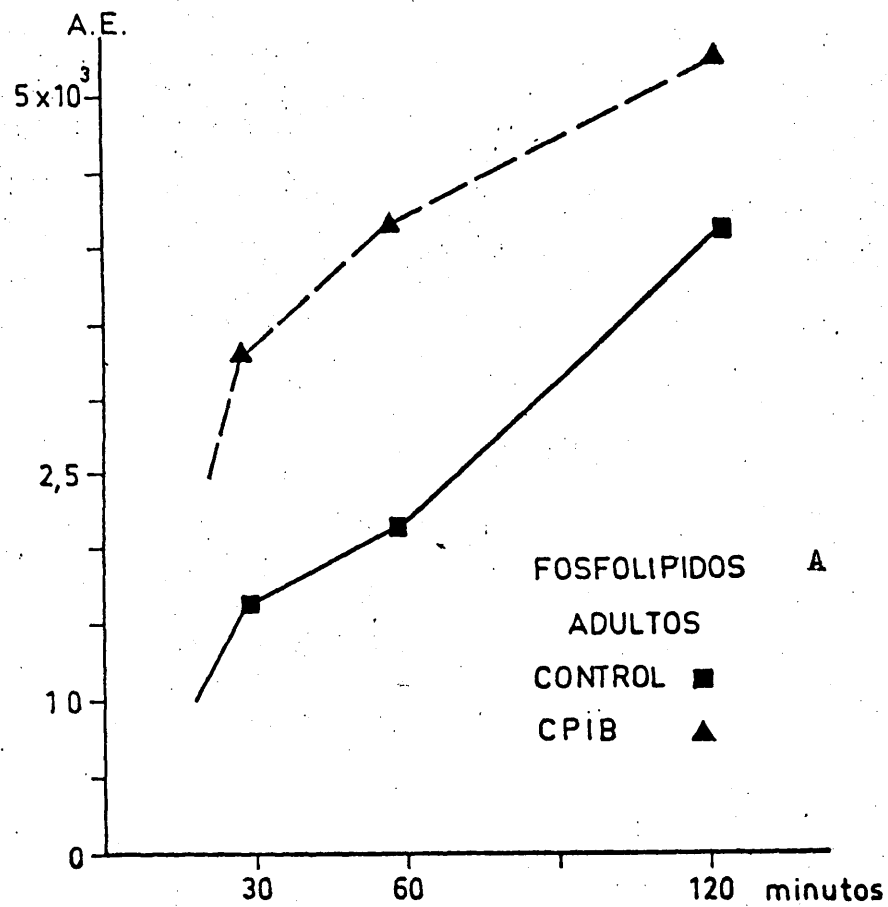
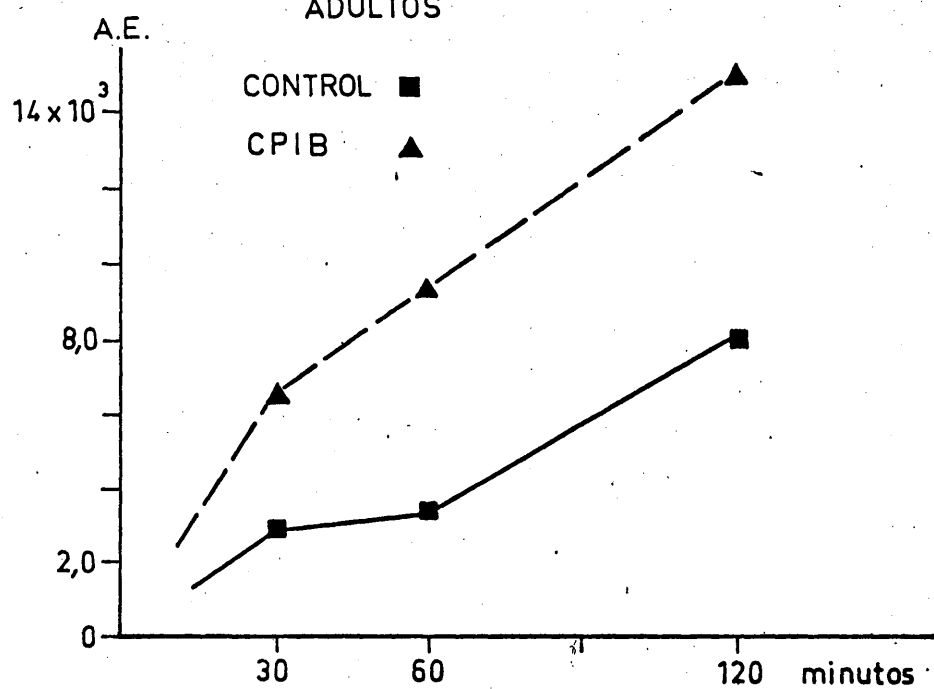


Figura 26.-

ACIDOS GRASOS C
ADULTOS



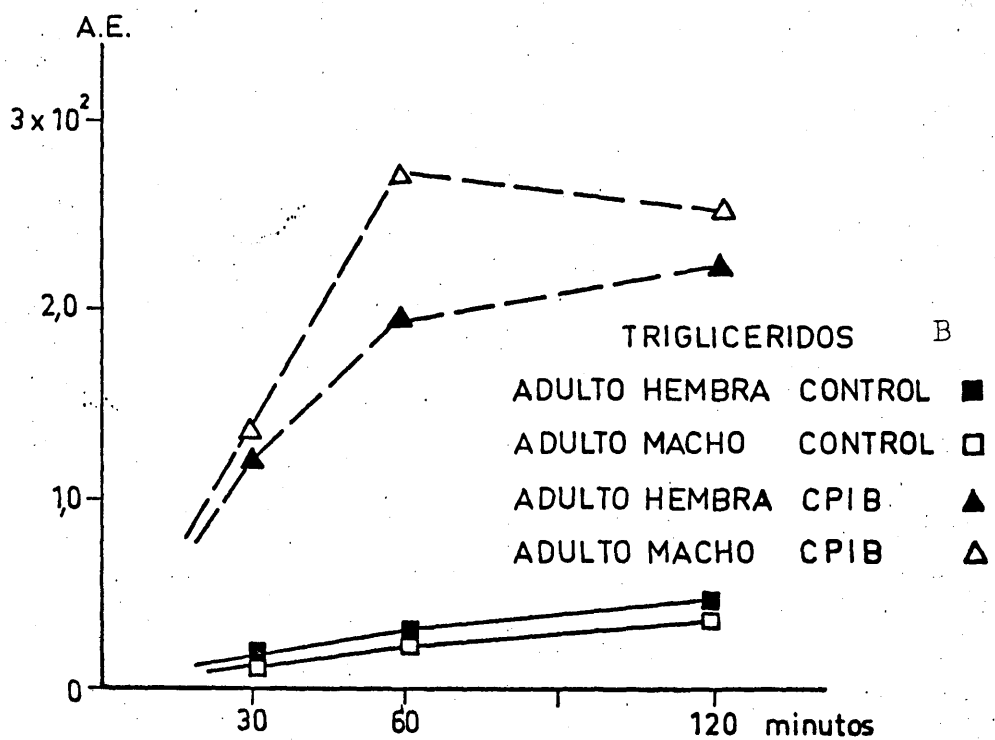
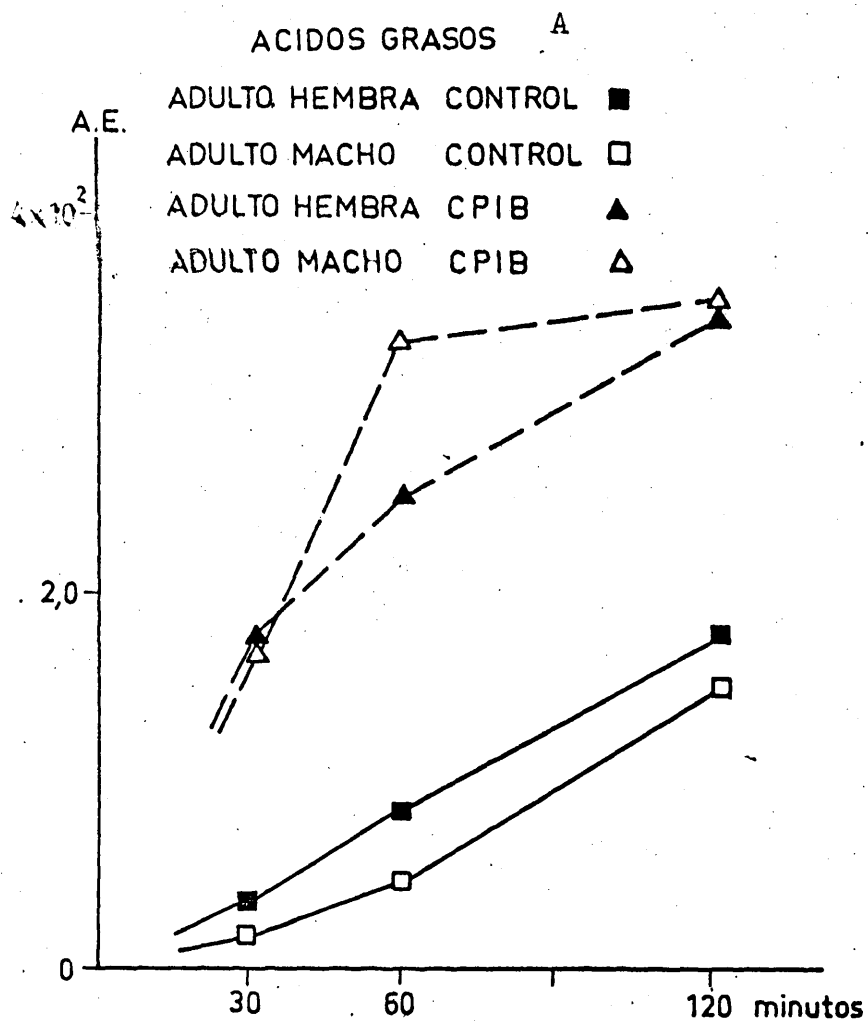
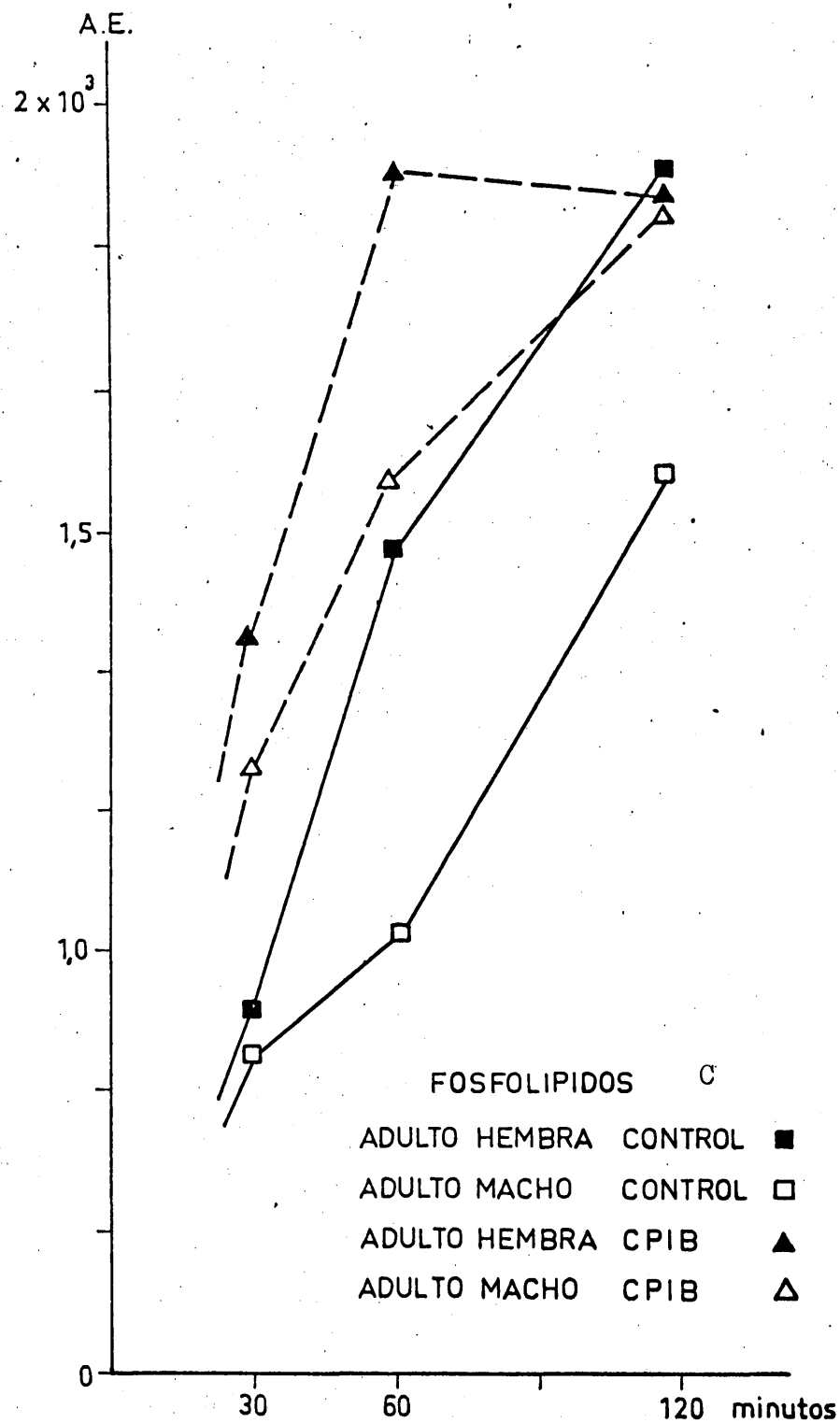


Figura 27.--



Es necesario hacer constar, en este momento, - que la incorporación de acetato marcado en las condiciones reseñadas no refleja biunívocamente la actividad biosintética de ácidos grasos a nivel de la enzima limitante de su biosíntesis que es la acetilCoA-carboxilasa, sino también de otras enzimas como acetilCoA-ligasa, acilCoA-sintetasas, acil-trasnferasas, etc., todas ellas comprometidas -- en el metabolismo de los ácidos grasos.

Probablemente, el efecto del CPIB en el metabo--lismo de ácidos grasos a partir de los datos obtenidos de la incorporación "in vitro" de acetato-1-¹⁴C a los lípidos de la larva, refeja una movilización de los ácidos grasos libres, un posible incremento de su biosíntesis a partir del precursor y una incorporación de los mismos a fosfolí--pidos y triglicéridos. En la larva, el efecto hipolipidé--mico del CPIB parece disparar un mecanismo de compensación sobre la base de un incremento del metabolismo de los áci--dos grasos que se incorporan a los triglicéridos, reser--va de energía necesaria para el farato-adulto que no po--see una fuente exógena de alimentación, y a los fosfolípi--dos, componentes mayoritarios de las cubiertas ecdisiales de la pupa. Esta interpretación es soportada por la ac--ción del CPIB en el farato-adulto, donde la energía nece--saria para el mantenimiento de la vida del insecto duran--te esta etapa quiescente se obtiene a partir de los tri--glicéridos que provienen del metabolismo de los ácidos - grasos (cfr. figura 25, B y C).

En el caso de los adultos, el incremento observado en la fracción correspondiente a fosfolípidos sugiere la recuperación progresiva que se va efectuando en el adulto tras la administración del CPIB, puesto que los fosfolípidos juegan un papel preponderante en la vida del insecto adulto (Fast, 1970).

* * *

A fin de comparar los resultados obtenidos en *Ceratitis capitata* con la acción del CPIB en mamíferos, se llevó a cabo la incorporación de acetato-1-¹⁴C a lípidos totales y a distintas clases de lípidos de hígado de ratas alimentadas con CPIB en la dieta. Los resultados se reflejan en la figura 28. La incorporación experimenta una reducción de un 46% inducida por el CPIB cuando se compara con los controles. Esta disminución se debe a las fracciones de diglicéridos y ácidos grasos libres. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gould et al. (1966); Ceñedella et al. (1971); Sodhi et al. (1971); Duncan et al. (1969) y Homcy (1974).

A la vista de los resultados se hace patente la diferencia de acción del CPIB, a este nivel, con respecto a *Ceratitis capitata*. Esta diferencia de acción se debe, probablemente, a las características del desarrollo del insecto, tal y como son afectadas por el CPIB.

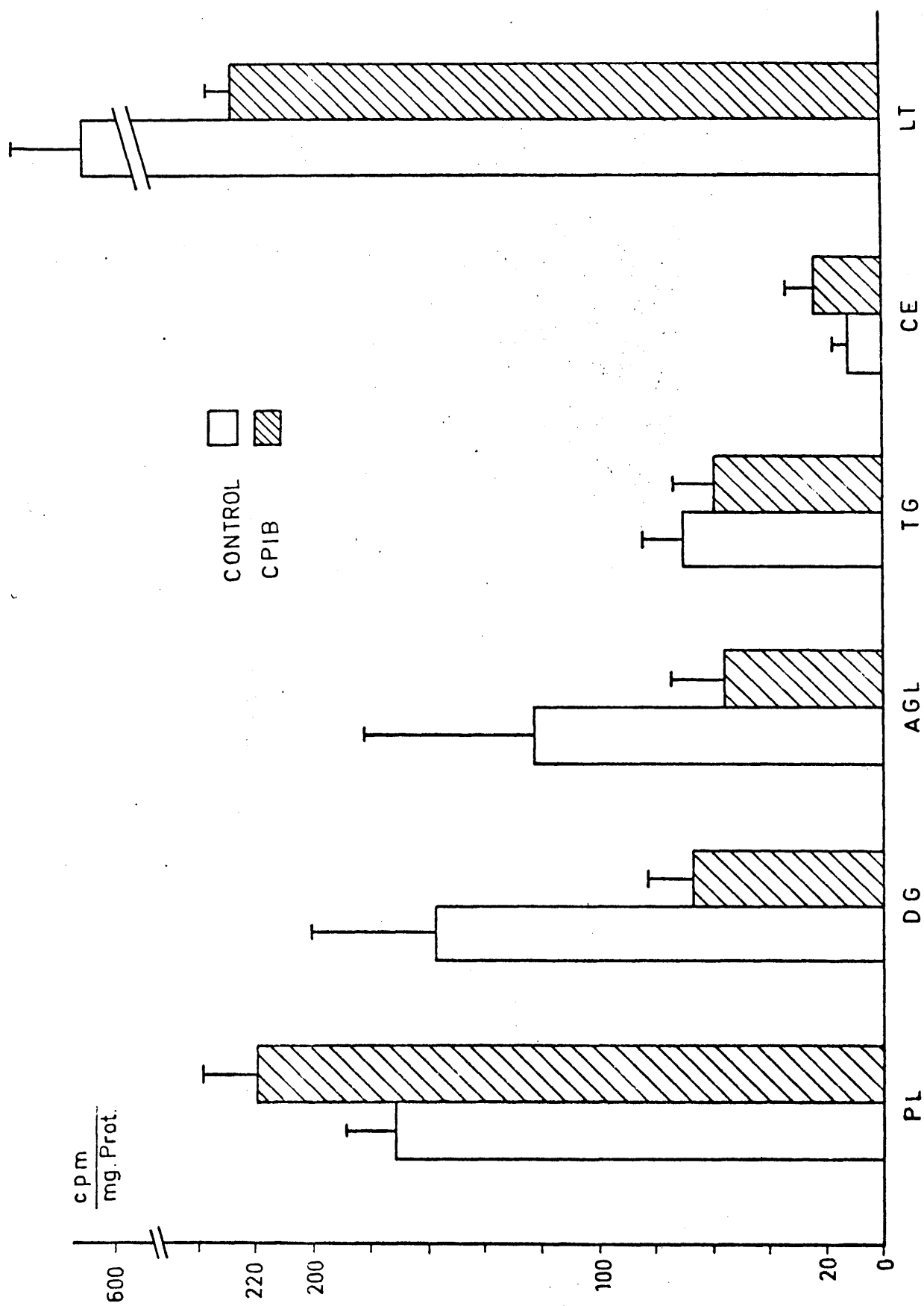


Figura 28.-

3.2.8. Efectos del CPIB en la incorporación de glicerol-2-³H.

La figura 29 muestra la incorporación "in vitro" a lo largo de 4 horas de glicerol-2-³H a triglicéridos y fosfolípidos durante el desarrollo de *Ceratitis capitata* en insectos controles y en insectos tratados con CPIB. La presencia de ATP en el medio de incubación se reveló necesaria a fin de activar la glicerol-quinasa que transforma el glicerol-3-P, sustrato indispensable para la biosíntesis de glicerolípidos según la ruta de Kennedy (1962).

El examen de los perfiles de incorporación en larvas reflejan una disminución de la incorporación a triglicéridos lo que puede significar una inhibición de la biosíntesis de triglicéridos. Tal vez esta inhibición de la biosíntesis de triglicéridos, esenciales para el desarrollo y crecimiento del insecto, esté relacionada con el retraso en la apolisis larva-pupa reseñada en el apartado 3.1.2.

En el estadio de farato-adulto el estudio de los perfiles de incorporación manifiesta una disminución de la radiactividad incorporada a fosfolípidos, mientras aumenta la correspondiente a la fracción de triglicéridos. Es posible que la inhibición de la biosíntesis de fosfolípidos - reflejada por estos resultados esté relacionada con la biosíntesis de triglicéridos, reservas necesarias para el mantenimiento vital de esta etapa quiescente, y que habían sufrido la acción hipolipidémica del CPIB en el anterior estadio (apartado 3.2.2.).

Por último, en el estadio adulto se observa un incremento de la radiactividad incorporada tanto a fosfolípidos como a triglicéridos lo que puede significar las posibilidades metabólicas de recuperación del adulto de *Ceratitis capitata* frente a la acción de agentes tóxicos durante el desarrollo.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sodhi et al. (1971) en mamíferos al aumentar la incorporación de glicerol-2-³H a triglicéridos y fosfolípidos.

3.2.9. Efectos del CPIB en la incorporación de ortofosfato-³²P.

A lo largo de 4 horas se siguió la incorporación de ortofosfato-³²P a lípidos de larvas, farato-adultos y adultos de *Ceratitis capitata* y se estudiaron los efectos que ejerce la administración del CPIB en la dieta larval sobre la biosíntesis endógena de los fosfolípidos totales y sobre las distintas especies de los mismos.

La figura 30 y la tabla 4 exhiben la radiactividad en cpm incorporada a las distintas clases de fosfolípidos a partir de ortofosfato-³²P. La máxima incorporación a lo largo de todo el desarrollo está representada por las especies de fosfatidiletanolamina.

En el estadio de larva, se manifiesta únicamente una disminución de fosfatidiletanolamina, mientras ex

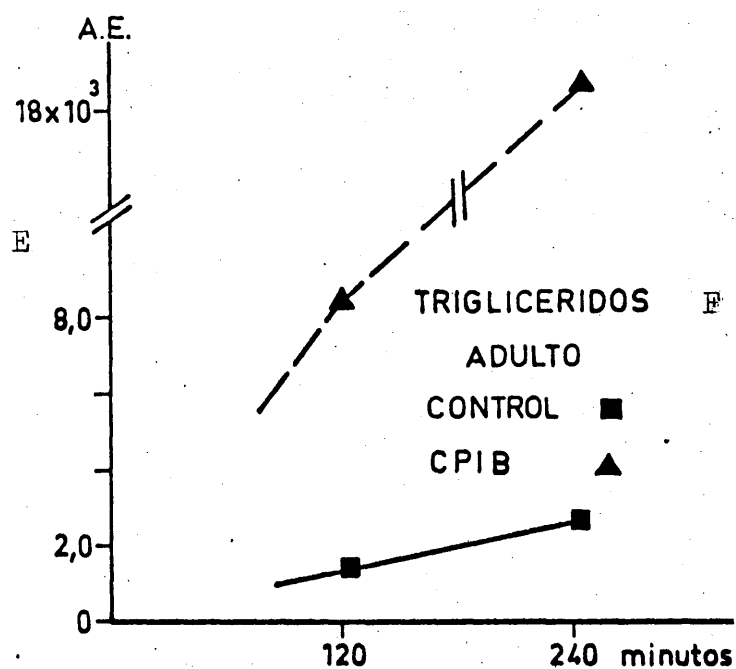
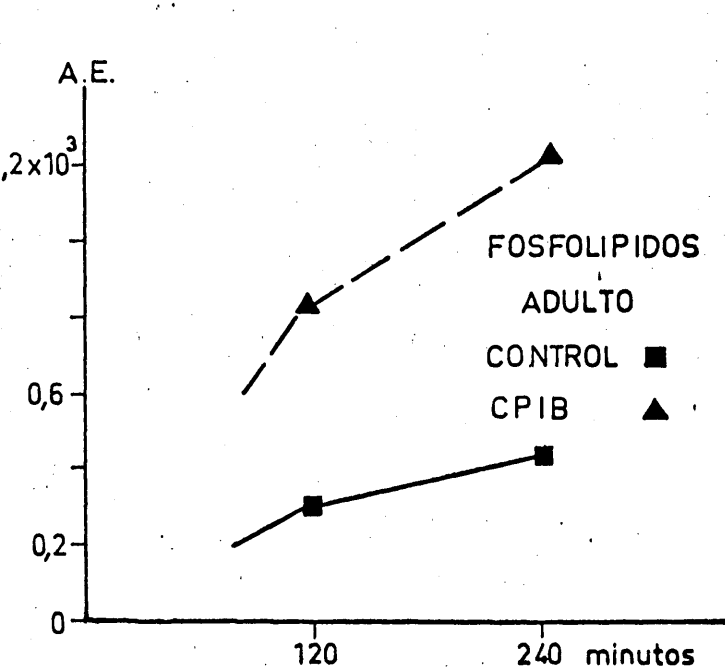
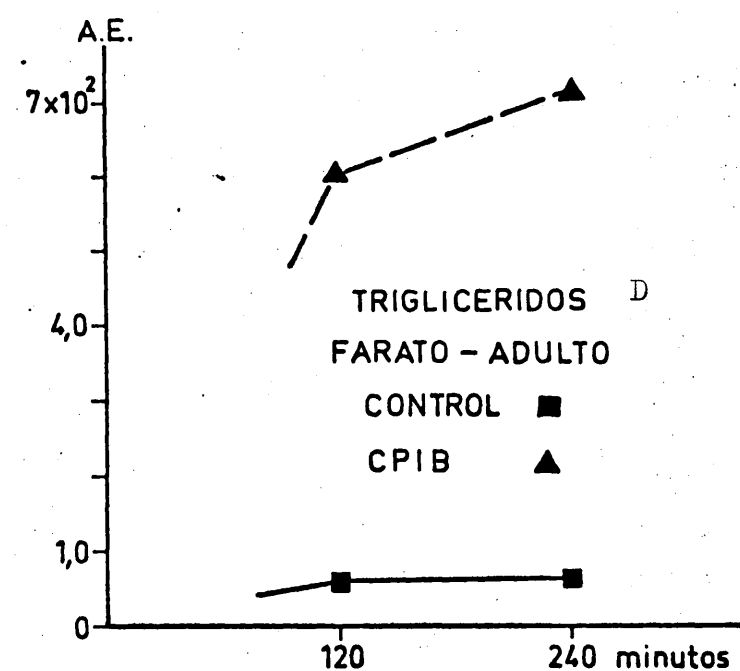
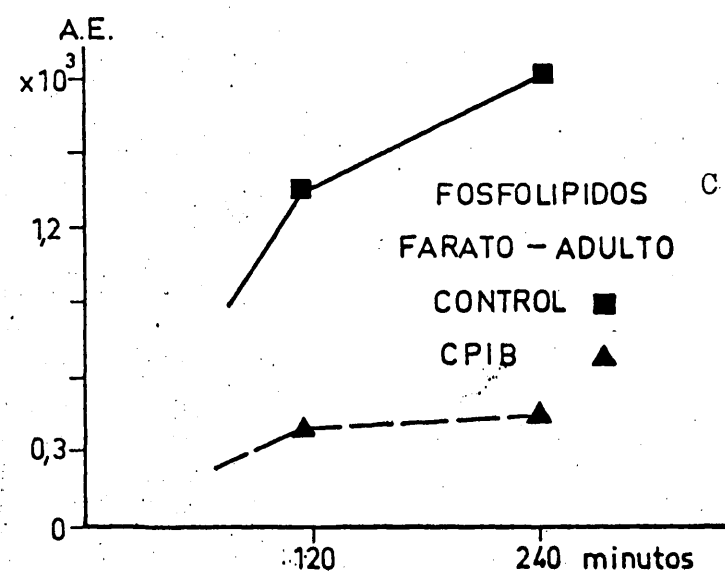
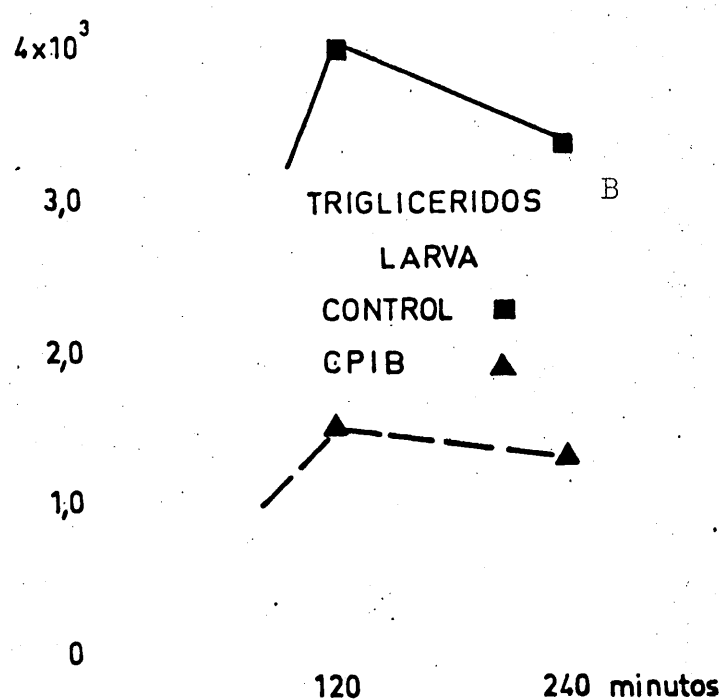
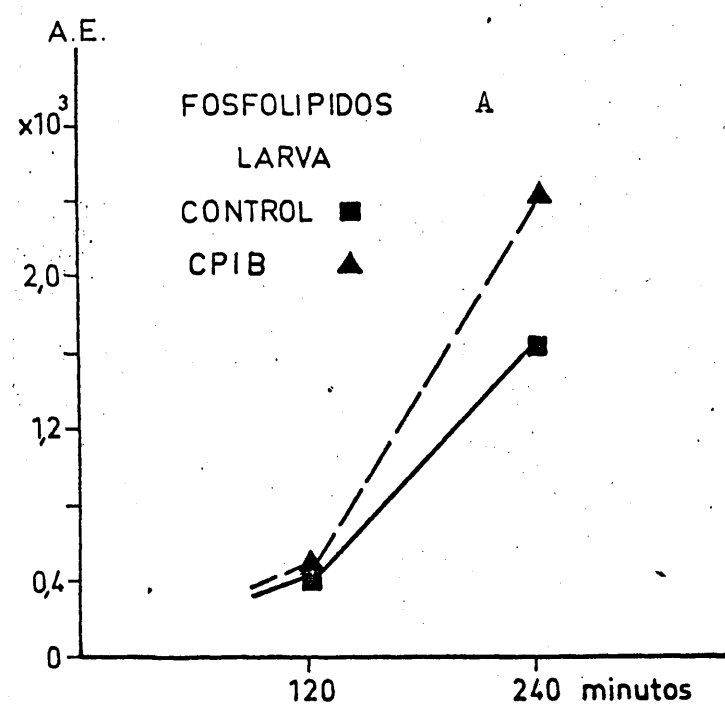


Figura 29.-

perimentan incremento las formas lisoderivadas a consecuencia del tratamiento con CPIB (tabla 4).

En el estadio de farato-adulto, el estudio de los perfiles de incorporación refleja el incremento de fosfatil-etanolamina, fosfatidil-colina, fosfatidil-serina y lisofosfatidil-etanolamina.

En el caso de los adultos, disminuye la radiactividad incorporada a fosfatidil-etanolamina y fosfatidil-colina y aumenta la correspondiente a lisofosfatidil-colina.

Tiempo	30 minutos		60 minutos		120 minutos		240 minutos	
	LPE	LPE	LPC	LPE	LPC	LPE	LPC	LPE
Larva-control	104	62	96	120	170	128	138	96
Larva-CPIB	262*	118*	184*	226*	228*	228*	336*	400*
Farato-adulto Control	308	130	216	214	68	252	314	216
Farato-adulto CPIB	266	156	618	566*	280	394*	218	418*
Adulto-control	1.720	146	348	44	276	88	280	48
Adulto-CPIB	1.262	22	848*	64	652*	90	318*	68

Tabla 4.- Incorporación en cpm de las formas lisoderivadas correspondientes a fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina, a partir de ortofosfato-³²P. Cada valor representa la media de tres determinaciones analíticas.
* P (t) < 0.01.

Los resultados obtenidos reflejan un efecto del CPIB muy selectivo sobre el metabolismo de los fosfolípidos. A tiempos largos (4 horas) la fosfatil-serina es la que aparece marcada en la ruta de incorporación de P_i en fosfolípidos individuales de mamíferos (Diringer, 1972), y puesto que la fosfatil-serina va aumentando a lo largo del desarrollo como efecto de la administración del CPIB, podemos concluir que la acción del CPIB, a este nivel, debe consistir en incrementar la biosíntesis de fosfolípidos.

En el caso de adultos la biosíntesis de fosfolípidos resulta inhibida, puesto que la fosfatidil-serina disminuye. Esta puede ser otra manifestación metabólica de que el efecto del CPIB va desapareciendo al llegar el insecto a la emergencia.

Por otra parte, las formas liso más importantes exhiben un escaso marcaje, desviándose la síntesis de especies de fosfolípidos a partir de fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina hacia fosfatidil-serina y lisofosfatidil-etanolamina, respectivamente, a lo largo del desarrollo.

En resumen, parece existir una acción del CPIB sobre el metabolismo de fosfolípidos en el sentido de un incremento de su formación, de una movilización de las especies de fosfolípidos a sus formas liso correspondientes, y de una interconversión de las especies más abun-

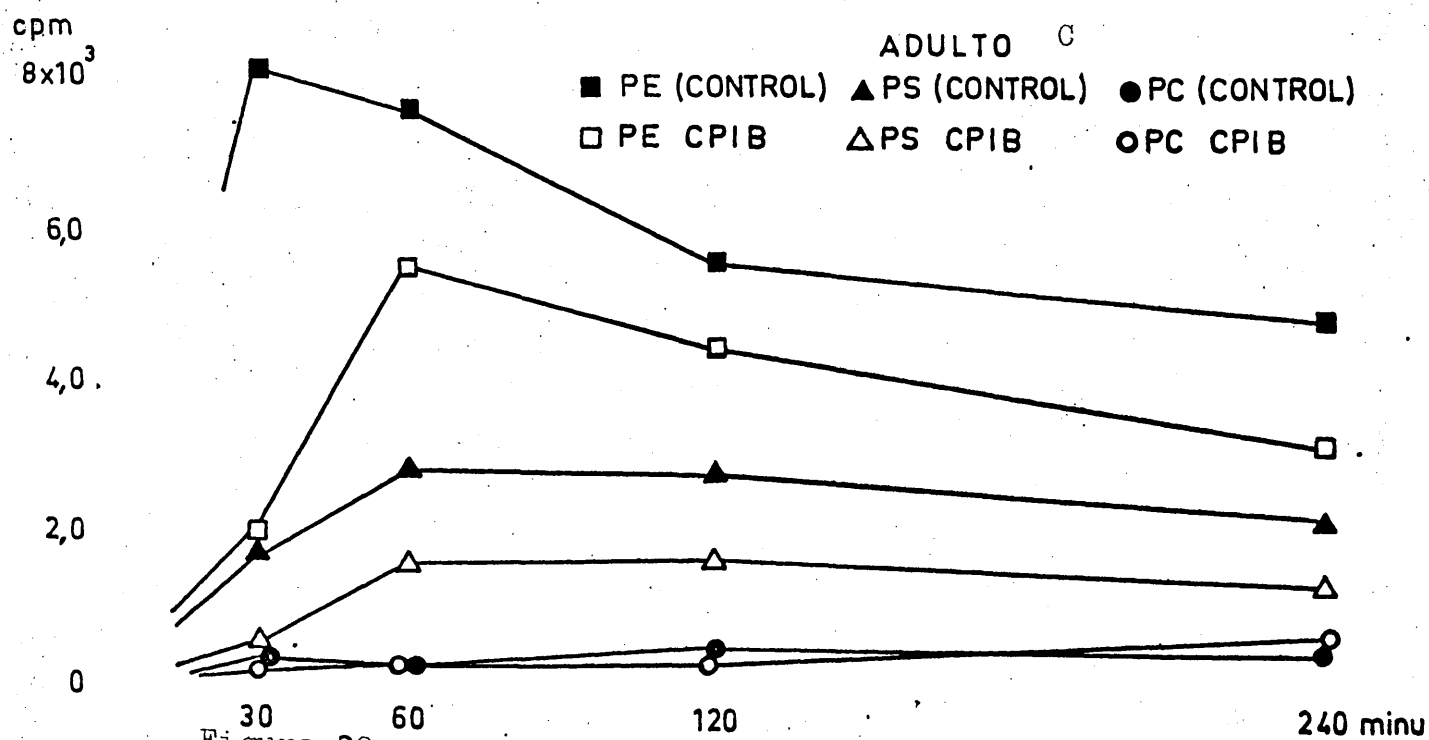
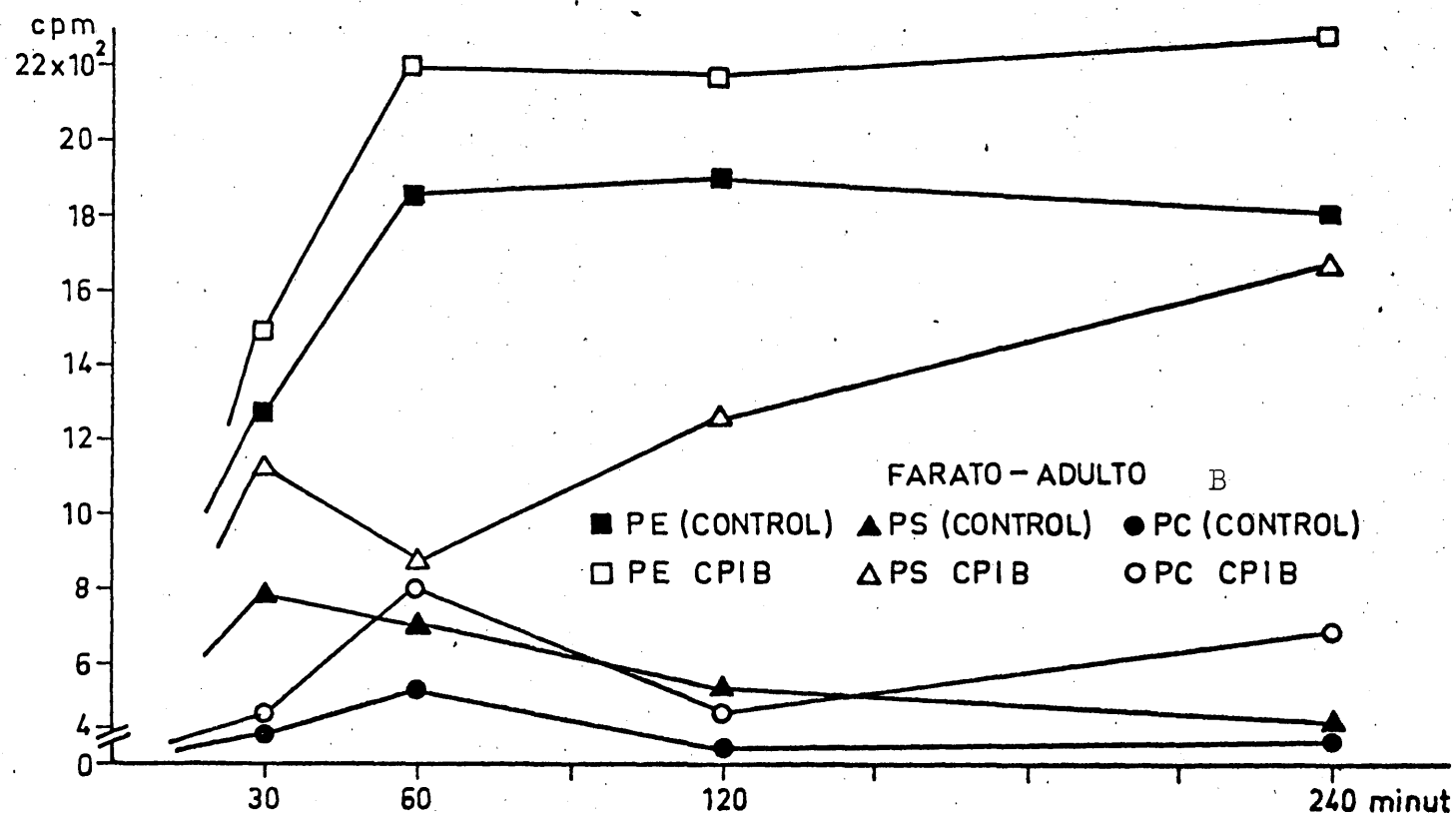
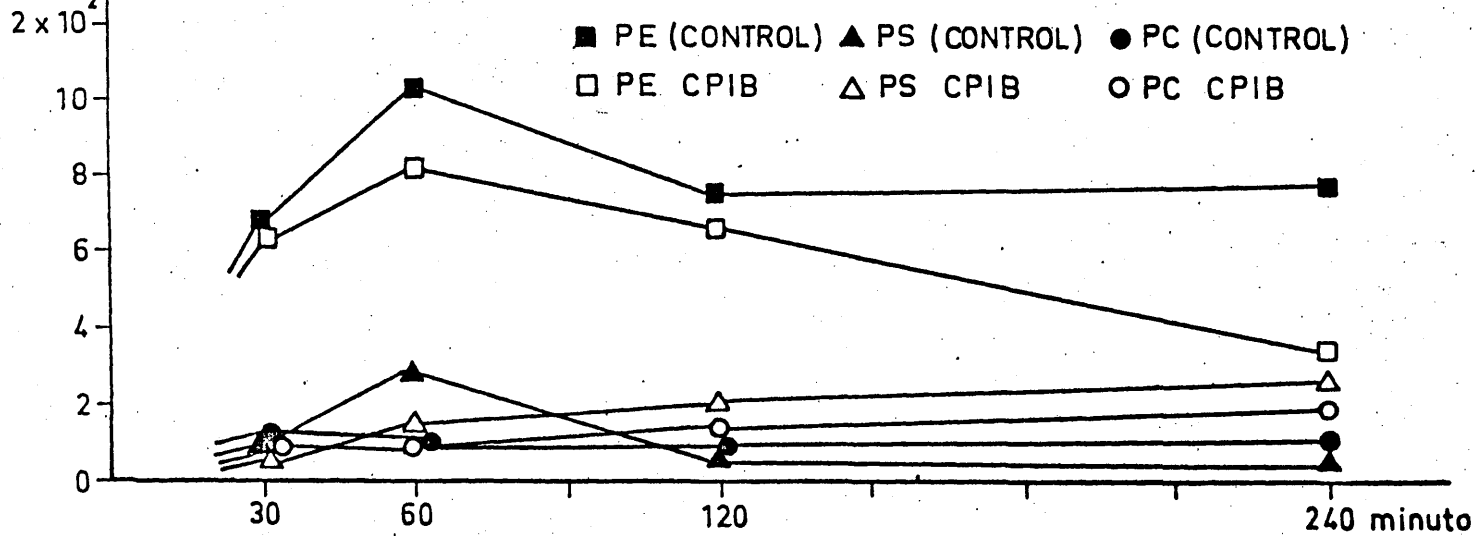


Figura 20.-

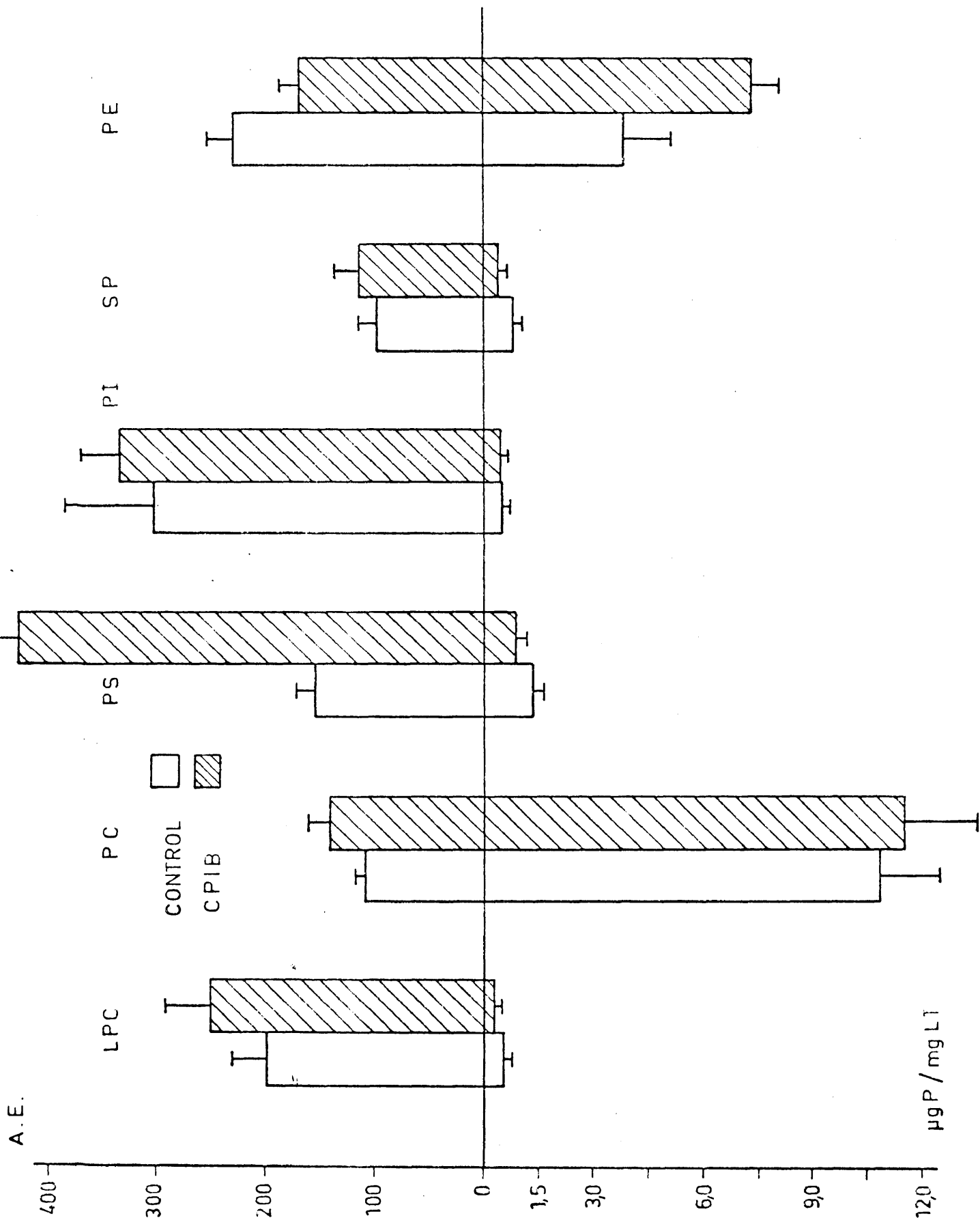


Figure 31. -

dantes como fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina - con fosfatidil-serina, mecanismos que juegan un papel importante en el desarrollo de insectos (Castillón et al., 1971, 1974; Jiménez et al., 1975).

* * *

Debido a la escasez de datos en mamíferos sobre la acción del CPIB en el metabolismo de fosfolípidos, - afrontamos el estudio de sus efectos sobre la incorporación "in vitro" de ortofosfato- ^{32}P a distintos fosfolípidos de hígado de ratas tratadas con CPIB en la dieta. Los resultados se reflejan en la figura 31.

Como en insectos, se exhibe un incremento de - fosfatidil-serina y una reducción de fosfatidil-etanolamina, sugiriendo una interconversión de estas especies de - fosfolípidos. La importancia de esta interconversión - es señalada por Kennedy (1962). Según este autor, la interconversión de fosfatidil-etanolamina y fosfatidil-serina conduce a cambios significativos en las características fisico-químicas de la membrana celular, de la que forman parte fundamental los fosfolípidos, puesto que fosfatidil-serina es capaz de ligar cationes a pH neutro, mientras que fosfatidil-etanolamina tiene poca capacidad para ligar cationes en esas condiciones. Además, es de destacar la influencia de la fosfatidil-serina en la estimula-

ción de la actividad de adenil-ciclasa de la membrana celular (Levey et al., 1973) por lo que se encuentra justificado un estudio comparativo del efecto del CPIB sobre el sistema enzimático de adenil-ciclasa ligado a membranas y los fosfolípidos.

3.2.11. Efectos del CPIB en la incorporación de ácidos grasos-1-¹⁴C.

En la figura 32 se expresan las radiactividades específicas correspondientes a distintas clases de lípidos a lo largo del desarrollo de *Ceratitis capitata* a partir de la incorporación "in vitro" de ácido deca--noico-1-¹⁴C.

El aumento de actividad específica inducido - por el CPIB es particularmente importante en la fracción de ácidos grasos libres de la larva; asimismo aumenta la incorporación de radiactividad de este ácido graso a tri--glicéridos y fosfolípidos y apenas se evidencia en digli--céridos y colesterol esterificado. En el farato-adulto el aumento de incorporación, inducido por el CPIB, se - hace patente en todas las fracciones lipídicas. En el - adulto, disminuye la radiactividad específica incorpora--da a ácidos grasos libres y aumenta la correspondiente a fosfolípidos, triglicéridos y diglicéridos.

En la figura 33 se muestran los resultados ob--tenidos a partir de la incorporación "in vitro" de ácido palmítico-1-¹⁴C.

La radiactividad específica incorporada a los ácidos grasos libres disminuye en la larva tras la administración del CPIB, así como la correspondiente a fosfolípidos, triglicéridos y diglicéridos, en contraposición con los resultados obtenidos en el caso del ácido decanoico-1- ^{14}C . En el farato-adulto sólo se refleja una disminución en el caso de diglicéridos y triglicéridos y esteres de colesterol. En adultos la acción del CPIB manifestada a lo largo del desarrollo, se revierte en el sentido de un incremento mayor o menor de las actividades específicas correspondientes a todas las fracciones.

En la figura 34 se expresan los resultados correspondientes al ácido linoleico-1- ^{14}C .

En la larva, la acción del CPIB se manifiesta como un incremento de la radiactividad específica de ácidos grasos libres, fosfolípidos, diglicéridos y triglicéridos, mientras en el farato-adulto, aumentan la incorporación de radiactividad correspondiente a diglicéridos. En el caso del adulto recién emergido aumenta la radiactividad específica incorporada a todas las fracciones lipídicas, y muy especialmente la correspondiente a fosfolípidos.

* * *

Se realizaron incorporaciones "in vitro" de diversos ácidos grasos- $1-^{14}\text{C}$ a lípidos totales y distintas clases de lípidos en hígado de ratas tratadas con CPIB en la dieta. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Los porcentajes de incorporación manifiestan una disminución generalizada, inducida por el CPIB. En caso del ácido palmitico- $1-^{14}\text{C}$, los resultados están de acuerdo con los descritos por Quagliariello (1974) y Landriscina (1975). En el caso del ácido decanoico- $1-^{14}\text{C}$ y el ácido palmítico- $1-^{14}\text{C}$, la disminución de la incorporación parece ocasionada por un aumento de su disponibilidad para incorporarse a diglicéridos y triglicéridos. En el caso del ácido linoleico- $1-^{14}\text{C}$, aumenta su incorporación a fosfolípidos, mientras disminuye la correspondiente a ácidos grasos libres.

Desde un punto de vista comparativo, se refleja en general, como en el caso del acetato- $1-^{14}\text{C}$ (apartado 3.2.7.), la diferencia de acción del CPIB en *Ceratitidis capitata* y en ratas por cuanto al metabolismo de los ácidos grasos se refiere. Sin embargo, coinciden los resultados de incorporación de ácido decanoico y ácido palmitico marcados a triglicéridos y diglicéridos, asimilándose más el esquema de acción del CPIB en las ratas al correspondiente a farato-adulto y adulto. Referente al ácido lino-

FOSFOLIPIDOS

A.E.

A.E.

ADULTO

LARVA FARATO-ADULTO

CONTROL

CPIB

2,0

1,0

TRIGLICERIDOS

A.E.

3 x 10⁶

ADULTO

LARVA FARATO-ADULTO

CONTROL

CPIB

2,0

1,0

ACIDOS GRASOS

10 x 10⁶

LARVA FARATO-ADULTO ADULTO

CONTROL

CPIB

4,0

1,0

DIGLICERIDOS

80 x 10³

CONTROL

CPIB

60

20

LARVA FARATO-ADULTO

ADULTO

ESTERES DE COLESTEROL

5 x 10³

CONTROL

CPIB

3,0



1,0

LARVA

FARATO-ADULTO

ADULTO

TRIGLICERIDOS

CONTROL 
CPIB 

LARVA

FARATO-ADULTO

ADULTO

A.E.
 $1,6 \times 10^{-5}$

FOSFOLIPIDOS

CONTROL 
CPIB 

LARVA



FARATO-ADULTO

ADULTO

A.E.
 18×10^{-6}

ACIDOS GRASOS

LARVA

CONTROL 
CPIB 



ADULTO

FARATO-ADULTO

A.E.

$2,3 \times 10^{-3}$

DIGLICERIDOS

CONTROL 
CPIB 

LARVA



FARATO-ADULTO

ADULTO

ESTERES DE COLESTEROL

A.E.

FARATO-ADULTO

CONTROL 
CPIB 

LARVA

ADULTO

Figura 33. -

1,0

0,2

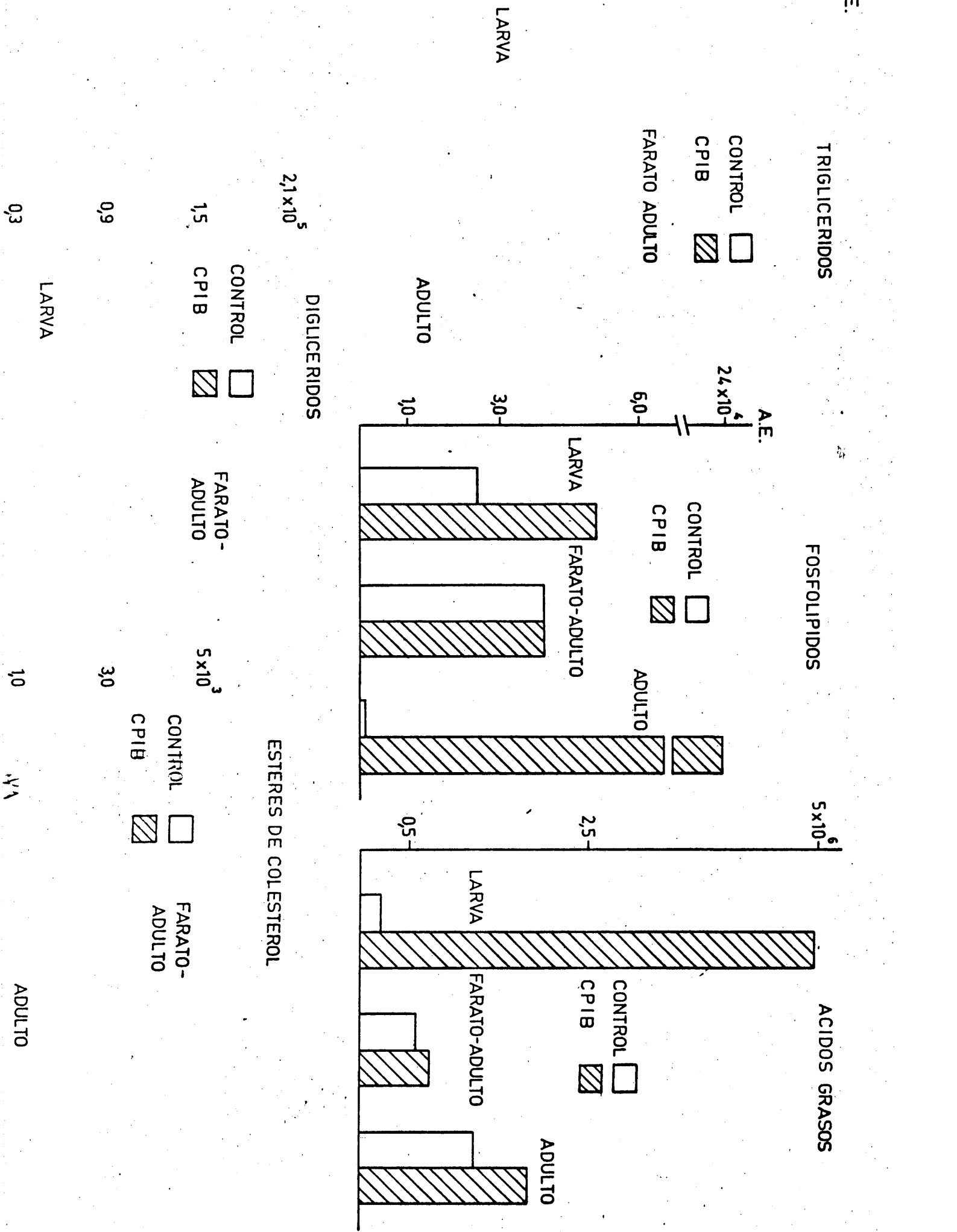


Figura 34.

leico coinciden los resultados en cuanto al aumento de radiactividad incorporada de este ácido graso a fosfolípidos.

La acción del CPIB, posiblemente, afecta alguna o algunas de las enzimas responsables de la utilización de los ácidos grasos para su incorporación a determinados lípidos. Por ejemplo, la actividad de acilCoA-transferasas que juegan un importante papel en la biosíntesis e intercambio de ácidos grasos entre las distintas especies de lípidos, estimulada por el CPIB en mamíferos (Capuzzi et al., 1974). La actividad de carnitín-acil-transferasa es también aumentada por el CPIB en mamíferos (Daae et al., 1973; Solberg, 1972; Kahonen, 1974) resultando una disponibilidad incrementada de los ácidos grasos y un aumento de la biosíntesis por elongación de los mismos (Daae, 1973).

Con respecto a este último punto, se realizaron estudios de elongación y desaturación de ácidos grasos a partir de diversos ácidos grasos- $1-^{14}\text{C}$ en hígado de ratas tratadas con CPIB en la dieta. Los resultados se expresan en la tabla 7, así como los porcentajes de variación sobre el control.

Los únicos ácidos grasos que exhibieron elongación y/o desaturación fueron los de diez, doce y catorce átomos de carbono, posiblemente debido a la ausencia de los sistemas enzimáticos especializados en la elongación de ácidos grasos de longitud de cadena mayor de catorce átomos de carbono en el homogeneizado utilizado.

Clases de lípidos	L T		P L		D G		A G L		T G		C E	
	CONTROL	CPIB	CONTROL	CPIB	CONTROL	CPIB	CONTROL	CPIB	CONTROL	CPIB	CONTROL	CPIB
10:0	4,3	0,89*	4,20	4,33	7,12	17,5*	65,27	29,26*	22,95*	49,26*	0,40	0,83*
	±0,46	±0,30	±2,12	±0,89	±2,8	±2,8	±2,05	±7,13	±3,31	±6,43	±0,08	±0,15
16:0	8,75	7,85*	42,10	43,86	8,62	12,02	26,7	14,32	19,82	29,24*	2,92	0,64*
	±0,35	±0,49	±5,45	±7,24	±2,60	±4,38	±5,77	±6,95	±2,74	±5,26	±0,84	±0,51
18:2	19,58	17,95*	23,55	40,42*	6,43	7,13	40,1	30,75*	26,3	20,45	3,62	1,30*
	±0,43	±0,10	±1,17	±3,59	±1,07	±0,97	±6,06	±2,75	±5,07	±2,98	±0,30	±0,11

Tabla 6.- Incorporación (%) de ácidos grasos marcado a L T y distintas clases de lípidos en hígado de ratas tratadas con CPIB en la dieta comparada con el de ratas controles. Los valores representan la media ± desviación estándar de 10 animales. La significación de los valores se realiza por medio del test t de Student. *P < 0.01.

En el ácido decanoico-1- ^{14}C el CPIB induce un aumento de su capacidad de elongación a ácido láurico (12:0) y su elongación y desaturación a ácido dodecenoico (12:1) . En el ácido láurico-1- ^{14}C , por su parte, el CPIB induce el incremento de elongación a ácido mirístico (14:0) mientras el ácido mirístico-1- ^{14}C no presenta variación significativa sobre el control, aunque manifiesta actividad elongadora.

Acido graso	10:0			12:0			14:0		
	Control	CPIB	%var.	Control	CPIB	%var.	Control	CPIB	%var.
12:0	12,51	22,54	+10*	-	-	-	-	-	-
12:1	3,49	6,56	+3*	-	-	-	-	-	-
14:0	-	-	-	10,32	19,73	+9,5	-	-	-
16:0	5,55	4,80	-10*	0,31	0,86	+0,5	2,82	2,61	-0,2
18:2	-	-	-	-	-	-	0,55	0,46	-0,1

Tabla 7.- Elongación, y elongación y desaturación (%) a partir de ácidos decanoico-1- ^{14}C (10:0), láurico-1- ^{14}C (12:0) y mirístico-1- ^{14}C (14:0) en hígado de ratas tratadas con CPIB en la dieta comparada con ratas controles. Cada valor representa la media de 10 animales. La significación se realiza por medio del test t de Student. * $P < 0,05$

El CPIB produce, por tanto, un aumento de la actividad de los sistemas enzimáticos responsables de la elongación y desaturación de los ácidos grasos de longitud de cadena corta, según los datos de Daae (1973) para

enzimas del tipo de las acilCoA-sintetasas y otras enzimas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos.

* * *

Las rutas que pueden seguir los ácidos grasos en el metabolismo son, principalmente, la oxidación y la incorporación a lípidos más complejos (cfr. Capuzzi, - 1974). El aumento de los ácidos decanoico (10:0) y linoleico (18:2) inducido por el CPIB en el metabolismo de los ácidos grasos refleja una movilización de los ácidos grasos hacia los lípidos complejos, disminuyendo su utilización como fuente de energía a través de la oxidación. La vía opuesta, es decir, una utilización preferencial como fuente de energía, vendría representada por la disminución de la incorporación de radiactividad inducida por el CPIB del ácido palmítico-1-¹⁴C.

Dada la importancia de este ácido graso en el metabolismo lipídico, una disminución de su biosíntesis o un incremento de su catabolismo en los estadios de larva farato-adulto próximos al momento de la apolisis, podrían influir en el sentido de inhibir o retrasar la metamorfosis de *Ceratitis capitata* (apartado 3.1.2.).

Con respecto a las variaciones que presentan los adultos de *Ceratitis capitata* sobre el modelo de acción del CPIB a lo largo del desarrollo del insecto, es

posible que signifiquen una manifestación de la recuperación de las reservas lipídicas, disminuídas por el CPIB - a lo largo del desarrollo, y que ahora serán necesarias - para el vuelo del adulto. Especialmente significativo - es el incremento inducido por el CPIB en la incorporación del ácido linoleico a fosfolípidos, cuyos niveles aumentan en la vida del adulto (Castillón et al., 1972; Fernandez-Sousa et al., 1970 y 1971). A su vez el efecto del - CPIB sobre la reproducción podría, en parte, explicarse - gracias a la acción del CPIB sobre el metabolismo del ácido decanoico, cuyo importante papel en las distintas fases de la reproducción de los insectos es bien conocido (House y Graham, 1967; Cohen y Levinson), 1972, en el sentido de - una reducción de la incorporación a la fracción de ácidos grasos.

3.2.11. Efectos del CPIB en la actividad de acetilCoA-carboxilasa.

En una tercera fase de la investigación, se contempló el estudio de dos enzimas claves en el metabolismo lipídico: acetilCoA-carboxilasa y triglicérido-lipasa, a fin de observar los efectos del CPIB en el desarrollo de - *Ceratitis capitata* desde el punto de vista de la regulación de los acontecimientos metabólicos que suceden a lo largo del mismo.

La figura 35 muestra la actividad de acetilCoA-carboxilasa de homogeneizados totales de larvas y farato-

adultos de *Ceratitis capitata* tratadas con CPIB comparada con la de insectos controles del mismo estadio de desarrollo o correspondientes en el orden temporal, a partir del día siguiente de la administración del CPIB en la dieta larval.

Durante los dos primeros días la actividad de la enzima aumenta. El retraso en el desarrollo efectuado por la droga implica una inhibición del 30% de la actividad enzimática, inhibición que continúa en el estadio de farato-adulto.

Los datos reseñados en el apartado 3.2.7. acerca de los efectos del CPIB en la incorporación de acetato- $1-^{14}\text{C}$, coinciden con esta inhibición de la enzima, - que también se ha encontrado en mamíferos (Maragoudakis, 1967).

Levinson (1973) señala el alcance de la inhibición de la acetilCoA-carboxilasa en larvas de *Dermestes maculatus* al reducir la síntesis de los ácidos grasos para los que el insecto es particularmente susceptible durante la ovogénesis y el crecimiento.

El CPIB parece actuar, por tanto, a nivel de la biosíntesis "de novo" puesto que bloquea el paso limitante de la velocidad de formación de los ácidos grasos.

Carlson y Ki-Han Kim (1973) postulan la exis- -

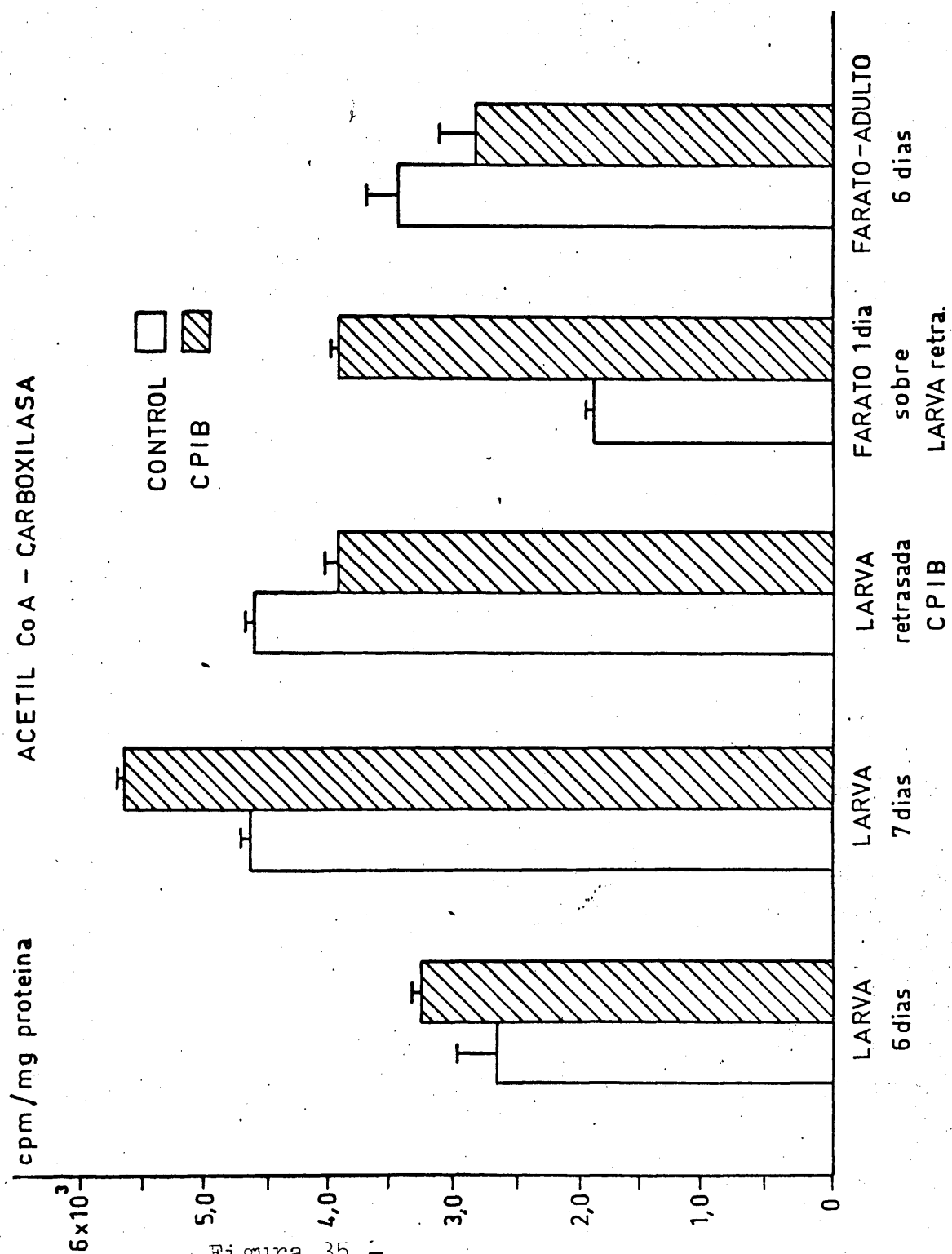


Figura 35.-

tencia de un mecanismo de control de la actividad de acetilCoA-carboxilasa hepática de rata por una interconversión implicando reacciones de fosforilación-defosforilación. Estos datos hacen interesante un estudio de la proteína-quinasa dependiente de AMPc en el desarrollo de Ceratitis capitata influenciada por la administración del CPIB.

3.2.12. Efectos del CPIB en la actividad de triglicérido-lipasa.

Se realizaron repetidos ensayos para descubrir actividad lipásica (pH 6,8) en Ceratitis capitata (cfr. Castillón et al., 1973) sin éxito. Sin embargo, se descubrió la capacidad de los homogeneizados larvales para hidrolizar tripalmitina a un pH básico. Colbeau (1974) señala la existencia de actividad de triglicérido-lipasa en hepatocitos de rata cuyo pH óptimo es 8,0 y sustrato específico los triglicéridos de cadena larga, designando a diferentes entidades proteicas la capacidad de hidrolizar triglicéridos en el hígado (Ledford, 1975).

Los resultados del estudio de la actividad de triglicérido-lipasa (pH 8,0) en insectos controles y tratados con CPIB en la dieta larval se muestran en la tabla 8.

Existe un incremento, inducido por el CPIB, de la actividad de esta enzima en el momento de la apolisis

larva-pupa. Es probable que este aumento esté relacionado con el incremento de los niveles de ácidos grasos libres manifestado anteriormente (apartado 3.2.1.), lo cual supone la acción del CPIB en la lipólisis en este momento del desarrollo del insecto.

Muestras	Larva (7 días)	Larva retrasada	Pupa (1 día)
Control	4,0	-	3,6
CPIB	10,0*	14,0	-

Tabla 8.- Actividad de triglicérido-lipasa expresada como nmoles de ácido graso liberado/mg proteína/hora en insectos controles y en insectos tratados con CPIB en la dieta larval. Cada medida es la media de tres determinaciones analíticas. *P(+) 0.001.

En insectos, la demostración de una auténtica actividad lipásica a partir de tripalmitina ofrece dificultades en los ensayos normales, sin embargo la presencia de lipasas en el cuerpo graso de *Manduca sexta* ha sido indicada por Chang y Friedman (1971) y Stevenson (1972).

* * *

Se realizaron experimentos encaminados a dilucidar la acción del CPIB sobre la actividad hidrolítica de tripalmitina en hígado de ratas. Los resultados que se muestran en la tabla 9 arrojan una inhibición del 36,9% -

inducida por el CPIB en el hígado de rata.

Los resultados obtenidos en *Ceratitis capitata* en contraposición con los obtenidos en ratas, probablemente reflejan la existencia de distintas lipasas reguladas de modo diferente en el insecto que en mamíferos (Soderling, 1973; Sudilovsky, 1974). Apoyando esta última hipótesis, Crabtree et al. (1972) afirman el hecho de que la triglicérido-lipasa de músculos voladores de varias especies no son activadas por AMPc, sugiriendo que o las actividades de la lipasa no son estimuladas por el nucleotido o bien las enzimas están presentes en los extractos ya en forma activada.

3.3. EFECTOS DEL CPIB EN EL SISTEMA AMPc-PROTEINA-QUINASA EN EL DESARROLLO DE CERATITIS CAPITATA.

En una última fase de la investigación se afrontó el estudio de los efectos del CPIB en el sistema AMPc-proteína-quinasa a fin de considerar el modo de acción del CPIB a un nivel más profundo.

3.3.1 Consideraciones previas.

Castillón et al. (1973) demostraron el incremento de actividad de adenil-ciclasa en el estadio de farato-adulto como uno de los hechos metabólicos consecuencia de

la acción de la hormona de la muda. Este efecto directo sobre la HM es una clara manifestación de la estimulación por una hormona esteroídica de la adenil-ciclasa, y coincide con la estimulación de la enzima de epidermis alar provocada por la inyección de β -ecdisona en *Hyalophora glovery* (Applebaum, 1972). Otros hechos experimentales en la misma dirección son los resultados de Gilbert et al. (1971) que han demostrado el aumento de AMPc tras la inyección de HM en pupas en diapausa y la inhibición de este proceso por la hormona juvenil. Esta especificidad sugiere una posible relación entre la actividad de la enzima y el papel fisiológico de la glándula protorácica.

Todos estos hechos postulan la existencia de un sistema de regulación hormonal en insectos análogo al descrito en mamíferos por Sutherland et al. (1969) y Robinson et al. (1971).

Sin embargo, la situación es más compleja. Los resultados de Leenders et al. (1970), hablan de una acción sinérgica del AMPc y la β -ecdisona de tal modo que se consigue la activación de algunos genes en los cromosomas politénicos de glándulas salivares de *Drosophyla hydei*. Estos autores demuestran un aumento en los niveles de AMPc en glándulas salivares previamente expuestas al tratamiento con β -ecdisona, utilizando un tipo de ensayo biológico.

Por otro lado, el aumento de la actividad de adenil-ciclasa que acompaña al incremento en la secreción de hormona de la muda (Castillón et al., 1973), no implica necesariamente una elevación simultánea en los niveles de AMPc que están influenciados también por la fosfodiesterasa correspondiente. Con respecto a este punto es la fosfodiesterasa la enzima que se considera gobierna los niveles tisulares del nucleotido (Cheung, 1970). Parece existir una correlación entre los elevados niveles de HM y los niveles incrementados de AMPc en el momento de la apolisis larva-pupa, y una falta de correlación entre la secreción de la hormona de la muda y los niveles de AMPc en los últimos días del estadio de farato-adulto. La actividad de fosfodiesterasa aumenta en los primeros días de la cuarta y quinta fase vital de la larva, seguido de un descenso en los últimos días. Estos autores sugieren inhibición de la fosfodiesterasa correlacionada con el aumento de hormona de la muda al final de cada fase. La fosfodiesterasa también podría estar activada por el aumento de hormona juvenil al comienzo de cada fase... (Williams et al., 1961). Las variaciones observadas son debidas a cambios en la población enzimática puesto que no se deben a la acción de un activador o inhibidor, ya que la adición de homogeneizado de farato-adulto al de larva no disminuye la actividad observada (Morishima et al., 1973).

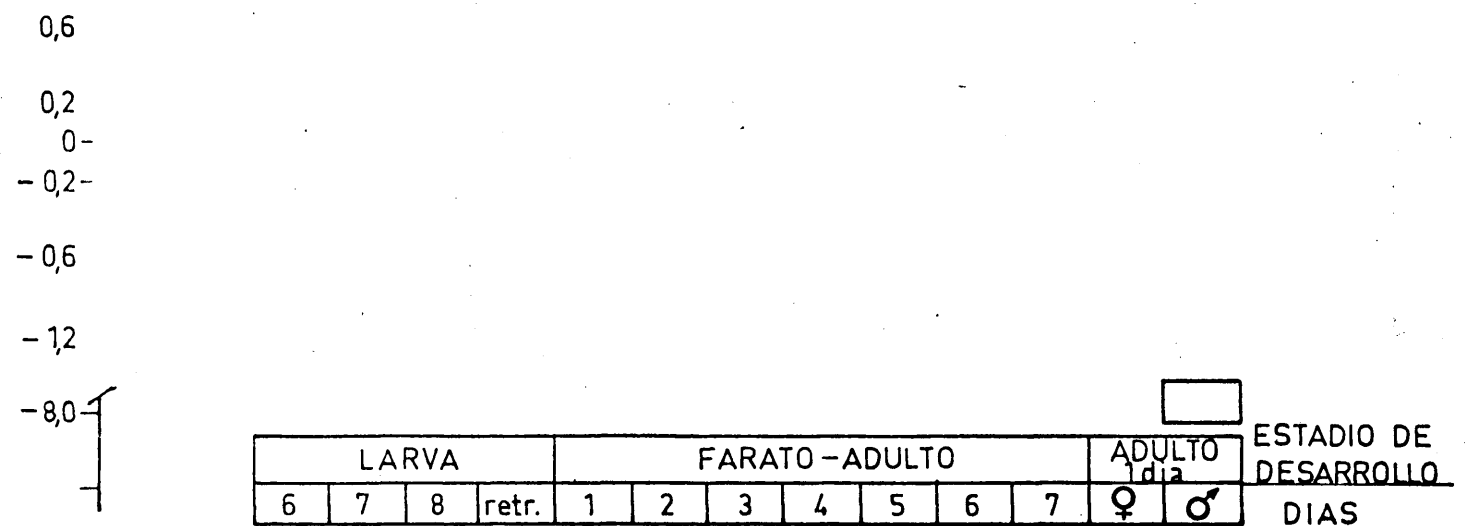
Además, se ha demostrado la existencia de múltiples formas de fosfodiesterasas, dependiendo principalmente de sus afinidades por los sustratos y su función. Actualmente se sabe que existen dos enzimas diferentes para los dos nucleótidos que se presentan en la naturaleza y en general hay una mayor afinidad de la fosfodiesterasa por el GMPc que por el AMPc (Russell et al. 1973). Este hecho conduce a la hipótesis de que el GMPc podría ejercer el efecto regulador postulado sobre la actividad de proteína-quinasa y afectar selectivamente la actividad de la fosfodiesterasa actuando sobre momentos del desarrollo del insecto y no detectados utilizando técnicas basadas en el otro nucleótido cíclico.

La función del cerebro durante el desarrollo de *Ceratitis capitata* puede ser responsable, al menos, en parte, de la máxima actividad de proteína-quinasa que regularía la génesis de la HM en la apolisis larva-pupa y en la transformación del farato-adulto en adulto, puesto que el cerebro del insecto induce la actividad de adenilciclase y los niveles de AMPc correspondientes a través de la hormona cerebral (Vedeckis y Gilbert, 1973).

3.3.2. Efectos del CPIB sobre el sistema AMPc-proteína-quinasa.

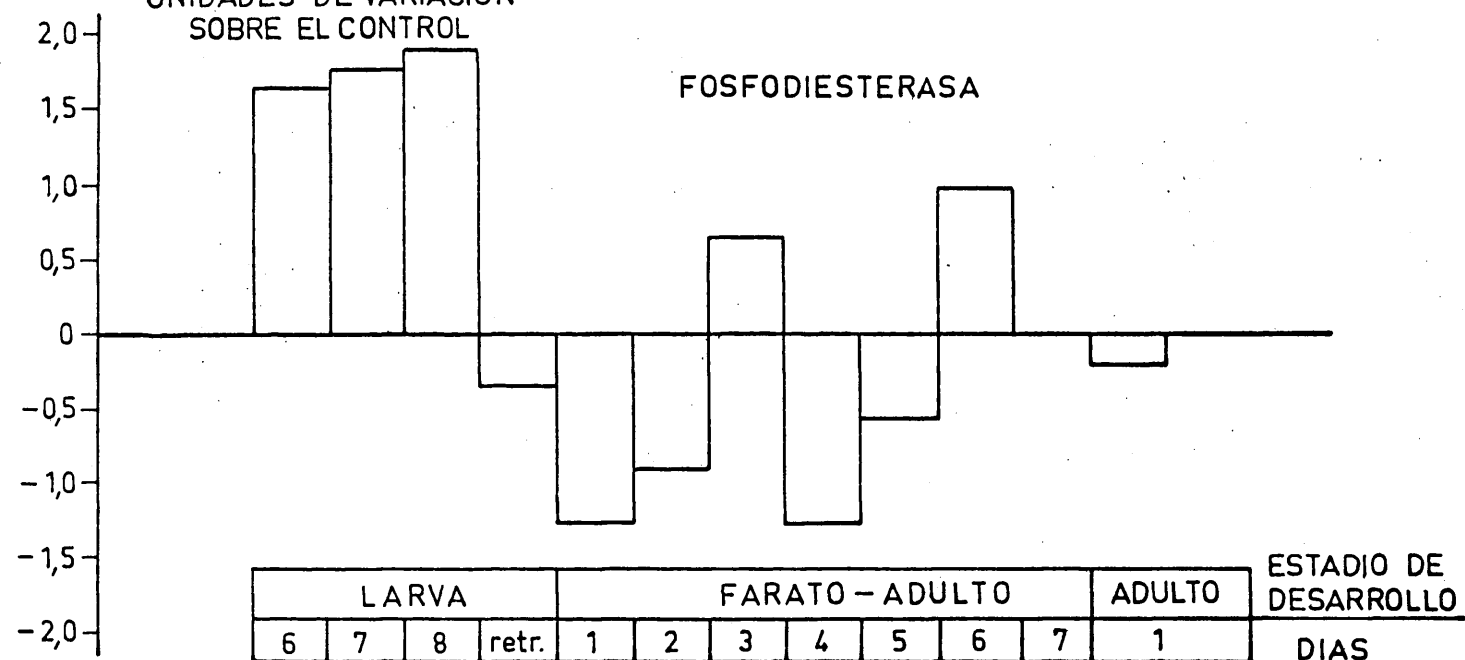
El estudio de los niveles de AMPc y del sistema proteína-quinasa está justificado tanto por los datos discu-

SOBRE EL CONTROL



UNIDADES DE VARIACION
SOBRE EL CONTROL

FOSFODIESTERASA



UNIDADES DE VARIACION
SOBRE EL CONTROL

PROTEINA - QUINASA

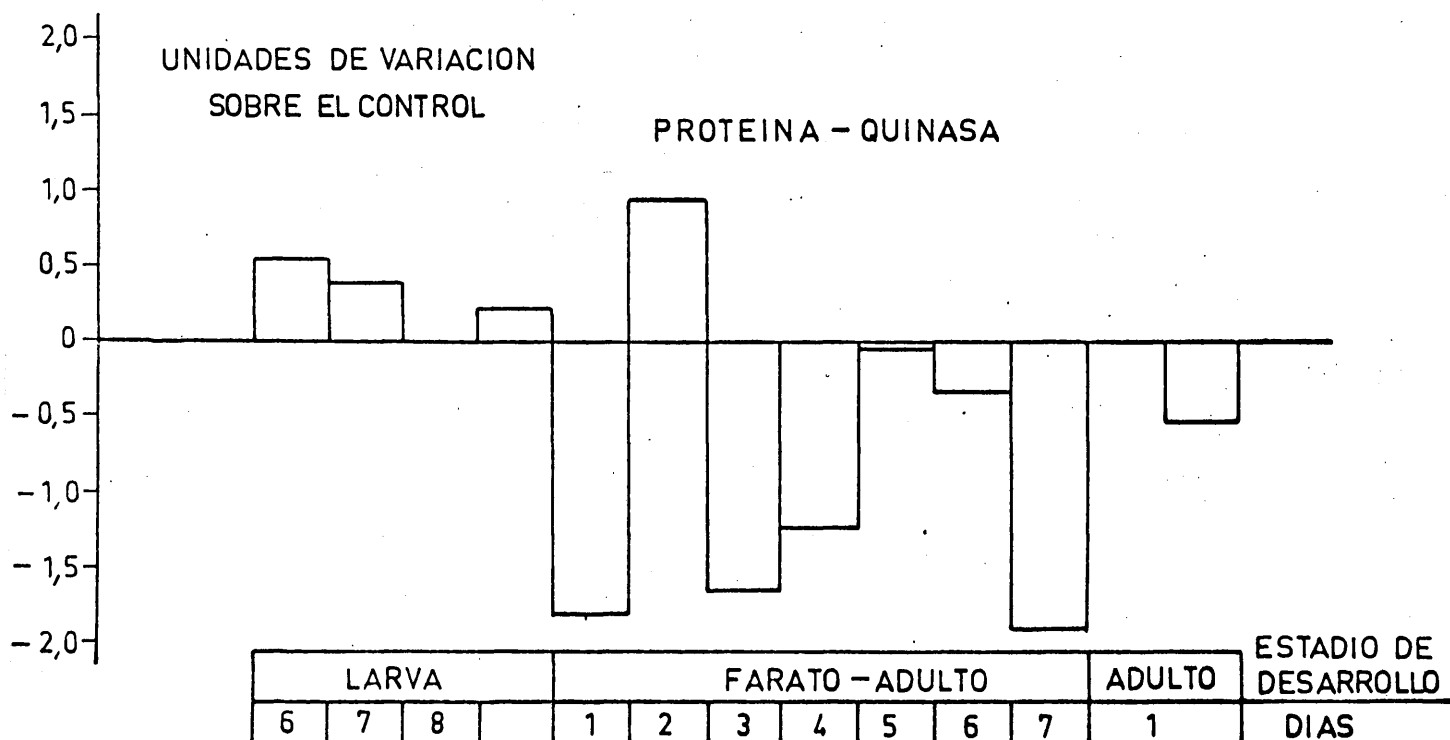


Figura 36.-

tidos en el apartado 3.3.1. como por la acción del CPIB en mamíferos que aparece mediada por el AMPc, la adenil - ciclasa y el sistema de proteína-quinasas (apartado 1.2.9.)

En la figura 36 A, se muestra la variación sobre el control de los niveles de AMPc en los distintos es tadios del desarrollo de *Ceratititis capitata* tras la administración de CPIB en la dieta larval. El CPIB produce una disminución en el momento en que la larva se dispone a sufrir la ecdisis que la transformará en farato-pupa. A partir del estadio de farato-adulto de 2 días, el efecto del CPIB se revierte resultando en un incremento de -- los niveles de AMPc sobre el control. Al llegar el mo-- mento de la emergencia, el farato-adulto experimenta de -- nuevo, una disminución inducida por el CPIB de los nive-- les de AMPc. La reducción de AMPc, ocasionada por el CPIB, es máxima en el adulto macho recién emergido.

Las variaciones inducidas por el CPIB en la actividad de fosfodiesterasa durante el desarrollo de *Ceratititis capitata*, se muestran en la figura 36B. Se observa un incremento de la actividad de la enzima en los días -- que siguen a la administración de la droga. Esta actividad disminuye posteriormente durante el desarrollo. Al llegar a la emergencia el farato-adulto experimenta -- un incremento de la actividad de fosfodiesterasa inducida por el CPIB. Estos cambios en la actividad fosfodiesterá sica se correlacionan, en general, con los cambios en los niveles de AMPc, a excepción de la etapa farato-adulto.

En la figura 36C se expresan las variaciones sobre el control de la actividad de proteína-quinasa dependiente de AMPc a lo largo de desarrollo de *Ceratit* capitata tras la administración de CPIB en la dieta larval. La actividad de proteína-quinasa aumenta en los días que siguen a la administración de la droga, pero experimenta una reducción progresiva a lo largo del desarrollo. En el momento de la emergencia aparece una reducción de la actividad de proteína-quinasa que se mitiga en el adulto recién emergido.

Estos cambios en la actividad de proteína-quinasa se muestran dependientes de los cambios en los niveles de AMPc durante el desarrollo, a excepción de la etapa correspondiente a farato-adulto.

* * *

Desde un punto de vista comparativo, los resultados del tratamiento con CPIB en la actividad de proteína-quinasa de hígado de rata, se muestran en la tabla 9.

La actividad de proteína-quinasa se reduce un 79,4% y el AMPc un 27,5%. Las variaciones, inducidas por el CPIB, en los niveles de AMPc y triglicérido-lipasa sugieren la idea de que el CPIB actúa en el metabolismo lipídico a nivel de nucleótidos. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de Huttunen (1970) según la

cual la actividad de la triglicérido-lipasa de tejido adiposo de rata, dependiente de AMPc y ATP, es activada por una proteína-quinasa procedente del músculo esquelético de conejo.

	Proteína-quinasa dep. AMPc	AMPc	Triglicerido- lipasa
Control	$3.04 \pm 0.32 \cdot 10^2$	1.09 ± 0.06	$6,28 \pm 0.74$
CPIB	$0.63 \pm 0.19 \cdot 10^2 *$	$0.81 \pm 0.13 *$	$3.96 \pm 0.23 *$

Tabla 9.- Actividades de proteína-quinasa, triglicérido-lipasa y niveles de AMPc en hígado de ratas tratadas con CPIB en la dieta comparadas con los datos obtenidos a partir de ratas controles. Cada valor representa la media y la desviación estandar de 10 animales.* $P < 0.001$.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de Ceratitidis capitata y en hígado de rata coinciden en los momentos cruciales de la vida del insecto, como son la apólisis larva-pupa y la emergencia del adulto, por lo que el CPIB posiblemente actúa en el desarrollo de Ceratitidis capitata a nivel de los nucleótidos cíclicos.

Por otra parte, la correlación entre la inhibición de proteína-quinasa durante la apólisis larva-pupa y la inhibición de la actividad de acetilCoA-carboxilasa en este mismo momento, apoya la hipótesis de Carlson (1973) sobre la regulación por proteína-quinasa de la actividad de esta enzima clave en el metabolismo lipídico.

Además, el aumento de triglicérido-lipasa en este momento del desarrollo contrapuesto con la inhibición de proteína-quinasa correspondiente, sugiere la existencia de un mecanismo regulador de la lipasa (pH 8,0) de *Ceratitis capitata* distinto al postulado en mamíferos por Huttunen (1970).

Por último, Rodbell (1968) y Levey (1973) demuestran el aumento en los niveles de AMPc y la activación del sistema de adenil-ciclasa por distintas hormonas en presencia de fosfatidil-serina. La recuperación de la reducción de AMPc, provocada por el CPIB, durante el desarrollo de *Ceratitis capitata* puede deberse a la presencia inalterada de fosfatidilserina a lo largo del desarrollo del insecto según señalamos en los apartados 3.2.5. y 3.2.9.

* * *

Las observaciones de Castillón et al. (1973), Catalán et al. (1974, 1975 y 1976) señalando la relación entre el sistema AMPc-proteína-quinasa y las hormonas reguladoras del desarrollo en *Ceratitis capitata*, sugieren que la acción del CPIB, de una manera directa o indirecta sobre el desarrollo de *Ceratitis capitata* se ejercen a nivel de la hormona juvenil o de la hormona de la muda, presentes ambas en el momento de la apolisis del insecto.

En el caso de la HJ, el CPIB podría retrasar el

desarrollo del insecto inhibiendo su síntesis a nivel del ácido mevalónico o el ácido acético (cfr. Gilbert, 1974), al modo como la droga actúa en mamíferos inhibiendo la biosíntesis de esteroides (Lakshmanan et al., 1968) o bien por un incremento de su secreción asociada con el aumento de fosfodiesterasa (cfr. Whitmore et al., 1973; Sociha, 1973; Reddy, 1973; Fytizas, 1973). En el caso de la hormona de la muda, el CPIB podría actuar desplazando a esta de las proteínas de la hemolinfa que la transportan del mismo modo como la droga actúa en mamíferos mediante su unión a albúmina plasmática (cfr. Thorp, 1971) o bien una inhibición de secreción de la HM provocada por inhibición del sistema de adenil-ciclase (cfr. Applebaum y Gilbert, 1972).

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio acerca de los efectos del CLOFIBRATO sobre el METABOLISMO LIPIDICO del insecto CERATITIS CAPITATA centrado en los siguientes aspectos generales:

- Influencia del clofibrato sobre diversos aspectos fisiológicos del desarrollo y sobre la fecundidad del díptero Ceratitis capitata.

- Influencia del clofibrato sobre los niveles, composición y distribución relativa de lípidos durante el desarrollo del insecto.

- Estudio de los efectos del clofibrato sobre el metabolismo lipídico durante el desarrollo de Ceratitis capitata a partir de la incorporación "in vitro" de diversos precursores isotópicos.

- Efectos del clofibrato sobre la regulación del metabolismo lipídico . Estudios "in vitro" a nivel de las enzimas responsables de la biosíntesis de ácidos grasos, de la lipólisis y del sistema AMP cíclico-proteína-quinasa durante el desarrollo del insecto.

Este trabajo ha sido precedido de un estudio bibliográfico sobre los diferentes aspectos relacionados anteriormente.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se deducen las conclusiones que se resumen a continuación:

1.- El peso de los insectos disminuye durante el desarrollo del insecto tras la administración de clofibrato. La apolisis larva-pupa sufre un retraso de dos días, y existe una reducción de la fecundidad del insecto como consecuencia de la acción de la droga.

2.- Los niveles de ácidos grasos libres, triglicéridos, fosfolípidos y colesterol del insecto experimentan alteraciones tras la administración de clofibrato durante el desarrollo. En general, se observa el efecto hipolipidémico del clofibrato, como en mamíferos.

Dada la importancia de la acumulación de triglicéridos para la realización de la metamorfosis larval, es posible que la reducción de triglicéridos inducida por el clofibrato esté relacionada con el retraso de la apolisis larva-pupa.

3.- Las especies de fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina disminuyen, sus plasmalógenos correspondientes aumentan, mientras las especies de fosfatil-serina no son alteradas por el clofibrato, en la larva y en el adulto recién emergido. En el farato-adulto, no existen alteraciones significativas de las distintas especies de fosfolípidos. Estas alteraciones corresponden a una acción del clofibrato sobre los sistemas enzi

máticos de acilación-desacilación que regulan el intercambio entre especies de fosfolípidos, así como a una inhibición de la biosíntesis endógena de fosfolípidos. Dado el papel que las especies de fosfatidil-colina juegan en la promoción del desarrollo de insectos, ambos fenómenos, reducción de fosfatidil-colina y retraso en la apolisis, inducidos por el clofibrato, pueden estar relacionados.

4.- El clofibrato modifica la composición normal de ácidos grasos en lípidos totales durante el desarrollo del insecto, siendo los cambios más notables, el incremento en la proporción relativa de ácido palmítico y esteárico y el descenso en las de palmitoleico, oleico y linoleico. Estos cambios son debidos a las variaciones en la composición de ácidos grasos de la fracción correspondiente a ácidos grasos libres. Los triglicéridos son responsables de los cambios en las concentraciones relativas a estos ácidos grasos en el farato-adulto y en el adulto hembra. Los fosfolípidos, por su parte, responden de las alteraciones de estos mismos ácidos grasos en el farato-adulto y en adultos tanto machos como hembras. Por otra parte, en el estadio de larva el clofibrato induce una disminución general del grado de insaturación de los ácidos grasos. Durante el estadio farato-adulto, no aparece variación significativa. En cuanto a los adultos, la variación producida por el clo-

fibrato se manifiesta en los machos mediante un aumento del grado de insaturación. Tanto la reducción de ácido oleico como la de linoleico, pueden correlacionarse con la inhibición simultánea del desarrollo del insecto debido a la importancia de estos ácidos grasos en el crecimiento y la metamorfosis larvales. Además, el aumento de ácido palmítico y la disminución de ácido oleico, mirístico y láurico, a su vez, están relacionados con la reducción de la fecundidad en las hembras de *Ceratitis capitata*, inducida por el CPIB, debido a la incidencia de estos ácidos grasos en la reproducción de insectos.

El estudio de los efectos del CPIB en la composición de ácidos grasos, realizados en hígado de ratas permiten la interpretación de los resultados obtenidos desde un punto de vista comparativo. Existe una semejanza en la acción del CPIB en ambas especies, que puede deberse a la influencia ejercida por la droga en los mecanismos de acilación y desacilación y sobre los sistemas enzimáticos de desaturación que regulan la interconversión de ácidos grasos de una y otra fracción lipídica.

5.- El efecto del clofibrato en el metabolismo de ácidos grasos a partir de los datos obtenidos de la incorporación "in vitro" de acetato- $1-^{14}\text{C}$ a los lípidos de la larva y farato-adulto refleja una movilización de los ácidos grasos libres para su conversión en triglicéridos.

En el adulto, por el contrario, la acción de la droga - se manifiesta en la conversión de los ácidos grasos en fosfolípidos, de acuerdo con las necesidades del insecto a lo largo de su desarrollo, deterioradas en parte por acción de la droga.

Desde el punto de vista comparativo, se hace patente, a este nivel, la diferencia específica de la acción de la droga, puesto que en ratas se produce un efecto contrapuesto al ocasionado en insectos.

6.- El efecto del clofibrato en el metabolismo de triglicéridos a partir de los datos obtenidos de la incorporación "in vitro" de glicerol-2-³H a los lípidos de larvas, refleja una reducción de la biosíntesis de triglicéridos. En el farato-adulto, existe una reducción de la biosíntesis de triglicéridos, contrapuesta con el aumento de la formación de fosfolípidos. En el adulto, el efecto de la droga consiste en el aumento de la formación de fosfolípidos y triglicéridos. Estas alteraciones del metabolismo de los lípidos neutros están relacionadas con la incidencia del clofibrato en el desarrollo del insecto.

7.- El metabolismo de fosfolípidos a partir de los datos obtenidos de la incorporación "in vitro" de ortofosfato-³²P refleja un incremento inducido por el clofibrato de la síntesis endógena de fosfolípidos en la larva, efecto que se revierte en el adulto, y una in

terconversión entre las especies más abundantes de fosfolípidos en insectos y sus plasmalógenos correspondientes, mecanismos que juegan un importante papel en el desarrollo de insectos.

Comparativamente, cabe destacar la semejanza de acción, a este nivel, del clofibrato en mamíferos e insectos.

8.- El estudio del metabolismo de los ácidos grasos a partir de los datos obtenidos de la incorporación "in vitro" de diversos ácidos grasos marcados, refleja una acción diferencial de la droga sobre estos ácidos grasos, en el sentido de un incremento del metabolismo de los ácidos decanoico y linoleico y una disminución del metabolismo del ácido palmítico en larvas y farato-adultos, acción -esta última- que se revierte en los adultos.

Desde el punto de vista comparativo, cabe destacar la diferencia específica de acción de la droga. Se sugiere el incremento, inducido por el clofibrato, de las enzimas responsables de la utilización de los ácidos grasos para su incorporación a determinados lípidos, así como de los sistemas enzimáticos de elongación, y de elongación y desaturación de ácidos grasos.

9.- La actividad de acetil-CoA-carboxilasa aumenta en larvas tras la administración de clofibrato, pero a partir del momento de la apolisis larva-pupa disminuye. El clofibrato actúa, pues, a nivel de la biosíntesis.

sis "de novo" puesto que bloquea el paso limitante de la velocidad de formación de los ácidos grasos, del mismo modo que en mamíferos.

10.- La actividad de triglicérido-lipasa es mayor en larvas tratadas con la droga que en insectos controles, en el momento de la apolisis. Resultados que se contraponen a los obtenidos en hígado de ratas tratadas con clofibrato, puesto que la actividad de triglicérido-lipasa hepática disminuye. Estos resultados sugieren la existencia de distintas lipasas reguladas de modo diferente en insectos y mamíferos.

11.- El estudio del sistema AMP cíclico-proteína-quinasa, revela alteraciones producidas por el clofibrato a lo largo del desarrollo del insecto, siendo especialmente significativas las alteraciones correspondientes a los momentos de la apolisis larva-pupa y la emergencia del adulto. Estos efectos sugieren que las alteraciones efectuadas por la droga en el desarrollo del insecto son debidas fundamentalmente a modificaciones en la síntesis, secreción o transporte ya de la hormona de la muda, ya de la hormona juvenil, que inciden, a su vez, en el metabolismo lipídico del insecto durante su desarrollo.

4. BIBLIOGRAFIA.

- ADAMS, L.L., WEBB, W.W., FALLON, H.J., J. Clin. Inv.,
50 (11), 2339-1246 (1971).
- ANDERSON, W.B., SCHNEIDER, A.B., EMMER, M., PERLMAN, R.L.,
PASTAN, I., J. Biol. Chem., 246, 5929 (1971)
- ANSARI, Musharaf A., Bochu-Kagaku, 38 (1), 1-5 (1973).
- APPLEBAUM, S.W., GILBERT, L.E., Develop. Biol. 27, 165 -
(1972).
- APPLEBAUM, S.W., GILBERT, L.E. Develop. Biol. 31, 345 -
(1973).
- AVOY, D.R., SWRYD., E.A., GOULD, R. G., J. Lip. Res. 6, -
369 (1965).
- AYERST LAB. INC., Clofibrate (Atromid-S), Clin. Pharma--
col. Therap. 5, 898-902 (1967).
- AZARNOFF, D., TUCKER, D., BARR, G., Metabolism, 14, 959 -
(1965).
- AZARNOFF, D., SVOBODA, D.J., Arch. Int. Pharmacodyn. 181,
386-93 (1969).
- AZARNOFF, D., L. Fedn. Proc. 30, 829 (1971).
- BADE, M. L., J. Insect Physiol, 10, 161 (1964).
- BAISSET, A., Therapie, 28 (4), 65 (1973).
- BALDONI, E., New Istanbul Contrib. Clin. Sci. 1043, 135-8.
(1972).
- BALDONI, E., Farmaco Ed. Sci., 28 (9), 713-21 (1973).
- BAR, H.P., HECHTER, O, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 63,
350 (1969).

- BARLOW, J.S., Can. J. Biochem. 42, 1365 (1964).
- BARTER, P., Metabol. Clin. Exp., 21 (2), 117-24 (1972).
- BARRETT, A., THORP, J., BritJ. Pharmac. Chem. 32, -
381-91 (1968).
- BARRETT, A. M., Brit. J. Pharmacol. 26, 363-71 (1966).
- BARROSO, C., MUNICIO, A.M., RIBERA, A., Comp. Biochem -
Physiol. 28, 239 (1969).
- BEAUDOIN, A.R., WILLEUVE, J.L. LEMONDE, A., J. Insect -
Physiol. 14, 831-40 (1968).
- BEAUMONT, J.L., DACHET, C., Nutr. Metab., 13 (6), 349-63
(1971).
- BERGER, F.M., DOUGLAS, J.F., LU, G.G., LUDWIG, B.J., -
Proc. Soc. Exp. Biol Med., 132, 293-7 (1969).
- BEENAKKERS, A.M., GILBERT, L.I., J. Insect Physiol., -
14 (4), 481-494 (1968).
- BEENAKKERS, A.M.T, Gen. Comp. Endocrin, 13, 492 -
(1969).
- BEENAKKERS, A.M.T., SCHERER, J.M.C., Insect Biochem, 1,
125 (1971).
- BERKOWITZ, D., Metabolism. 14 (9), 966-975 (1965).
- BEST, M.M., DUNCAN, C.H., Circulation, 28, 690 (1963).
- BEST, M.M., DUNCAN, C.H., J. Lab. Clin. Med., 64, 634-42 (1964).
- BEST, M.M., DUNCAN, C.H., Amer. J. Cardiol., 15, 230 (1965).
- BIERMAN, E.L., PORTE, D. Jr., BRUNZELL, J.D., Clin. Res.,
537 (1970).
- BHAKTAN, N.M.G., GILBERT, L.I., J. Insect Physiol. 16,
1783 (1970).

- BLIGH, E.G., DYER, W.J. J. Insect Physiol, 16, 1973 -
(1970).
- BONNICI, A., Clin. Endoc. (Oxford), 2, (3), 265,75 (1973).
- BORKOVEC, Z., Insect Chemosterilants (Interscience Pub.,
New York, London, Sidney (1966).
- BROODES, R.F., CRANHAM, J.E., GREENWOOD, D. STEVENSON, H.A.
Sci. Food Arg., 9, 111-15 (1958).
- BROSTROM, M.A., Reiman, E.M., WALSH, D.A., KREBS, E.G.,
Adv. in Enzyme Regul. (Ed. por G. Weber) 8,191
Pergamon Press, New York (1970).
- BROWN, B.L., EKINS, R.P., TAMPION, W., Biochem J., 120, 8
(1970).
- BURDETTE, L., "Invertebrate Endocrinology and Hormone Hete-
terophylly". Springer-Berlag (Berlin), (1974).
- CANDY, D.J., KOLBY, B.R. "Insect Biochemistry and Fun--
tion". Chapman y Hall (1974).
- CAPUZZI, D.M., LACKMAN, R.D., UBERTI, M.O. REED, M.A., Bio-
chem. Biophys. Res. Comm., 60 (4), 1499-1507 -
(1974).
- CAPUZZI, D.M., LACKMAN, R.D., ALEXANDER, J., INTERZO, CH.
M., REED, M.A., Biochim. Biophys. Acta, 409, -
144-155 (1975).
- CARLSON, L.A., ORO, L., Acta Med. Scand., 172, 641 (1962).
- CARLSON, L.A., WALLDIUS, G., BUTCHER, R.W., Atherosclerosis
sis, 16, 349-57 (1972).
- CARLSON, L.A., KI-HAM KIM, J. Biol Chem., 248 (1), 378-
380 (1973).

- CARTER , E.A., Life Sci. 13 (7), 907-17 (1973).
- CASTILLON, M.M., CATALAN, R.E., MUNICIO, A.M., SUAREZ, A.,
Insect Biochem., 1 (2), 237-243 (1971).
- CASTILLON, M.P., CATALAN, R.E., MUNICIO, A.M., SUAREZ, A.,
Comp. Biochem. Physiol., 388, 109-117 (1971).
- CASTILLON, M.P., JIMENEZ, C., CATALAN, R.E., MUNICIO, -
A.M., Insect Biochem. 1, 309-315 (1971).
- CASTILLON, M.P., CATALAN, R.E., MUNICIO, A.M., FEBS Lett.,
32 (1), 113-115 (1973).
- CASTILLON, M.P., CATALAN, R.E., VEGA, S., MUNICIO, A.M.,
Comp. Biochem. Physiol., 448 (3) 639-646 (1973).
- CASTILLON, M.P., CATALAN, R.E., JIMENEZ, C., MADARIAGA, -
M.A., MUNICIO, A.M., SUAREZ, A., J. Insect Phy-
siol., 20, 507-512 (1974).
- CASTILLON, M.P., CATALAN, R.E., MUNICIO, A.M., SUAREZ, A.,
Insect Biochem., 4, 395-400 (1974).
- CATALAN, R.E., MUNICIO, A.M., Biochem. Biophys. Res. Comm.,
61, (4), 1349-1399 (1974).
- CATALAN, R.E., CASTILLON, M.P., MUNICIO, A.M., Biochem. -
Biophys. Res. Comm., 65 (1), 385-391 (1975).
- CATALAN, R.E., CASTILLON, M.P., MUNICIO, A.M., Biochem.
Biophys. Res. Comm., 69 (4), 914-919 (1976).
- CATALAN, R.E., VILA, T., CASTILLON, M.P., Experientia, 32,
843-844 (1976).
- CEDERBAUM, A.J., RUBIN, E., Biochem. Pharmacol., 23, 1985-
1996 (1974).
- CEDERBAUM, A.J., THIRUMALAI, V., MACHAVAN, RUBIN, E., Bio-
chem. Pharm. 25, 1285-1292 (1976).

- CEDENELLA, R.J., JARRELL, J.J., SAXE, L.H., J. Atheroscl. Res. 8, 903 (1968).
- CENEDELLA, R.J., Lipids, 7 (10), 644 (1972).
- CENEDELLA, R.J., CROUTHAMEL, W.G., J. Lip. Res. 17, 156-166 (1976).
- COHEN, E., LEVINSON, Z.H., Life Sci. 11 (2), 293-99 (1972).
- COHEN, V.I., RAICHT, R.F., SHEFER, S., MOSBACH, E.H., Biochem. Biophys. Acta 369, 79-85 (1974).
- COLBEAU, A. Biochemie, 56 (2), 275-88 (1974).
- COOPER, R.H., Mc PHERSON, M., SCHOFIELD, J.G., Biochem. J., 127, 143 (1972).
- CORBIN, J.D., KREBS, G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 328-336 (1969).
- CORBIN, J.D., REIMANN, E.M., WALSH, D.A., KREBS, E.G., J. Biol. Chem. 245, 4849 (1970).
- COUNSELL, R.E., KLIMSTRO, P.D., RANNEY, R.E., COOK, D.J., Med. Pharm. Chem. 5, 720 (1962).
- CRABTREE, A. NEWSHOLME, Biochem J., 130, 697-705 (1972).
- CRAIG, W.M., Atherosclerosis, 15 (2), 265-71 (1972).
- CRATNETTER, D., GEUZAERVA, H., Arch. Int. Pharm. Ther., 193 (1), 73-9 (1971).
- CRONE, H.D., J. Insect. Physiol. 13, 81 (1967).
- CRONE, H.D., BRIDGES, R.G., Biochem. J., 89, 11-21 (1963).
- CROUTHAMEL, W.G., CENEDELLA, R.J., Pharmacology, 13 (5), 465-73 (1975).
- CURTIS-PRIOR, P.B., Atherosclerosis, 19 (3), 463-7 (1974).
- CHANG, S., FIEDMAN, S., Insect Biochem. 1, 63 (1971).

- CHASSEAUD, L.F., COOPER, A.J., SAGGERS, V.H., J. Clin. Pharmacol., 14, 382 (1974).
- CHEN, C.Y., Biochem. Pharmacol., 20 (12), 3509-19 (1971).
- CHEUNG, W.Y., Adv. In Biochem. Psychopharm. 3, 51 (1970).
- CHINO, H., GILBERT, L.I., Insect Physiol. 11, 287 (1965).
- CHINO, H., GILBERT, L.T., Insect Biochem., 1, 337 (1971).
- CHMERLAROVA, M. CHMELAR, M., Eur. J. Biochem., 44, 235 (1974).
- CHOJNACKY, T., KORZYBSKY, T., Acta Biochem. Pol. 9, 95-110 (1962).
- CHOJNACKY, T., KORZYBSKY, T., Acta Biochem. Pol., 10, 455-461 (1963).
- DAAE, L.N.W., Atherosclerosis, 17 (3), 389-400 (1973).
- DADD, R.H.J., Insect Physiol. 13, 763 (1967).
- DADD, R.H.J., Chem. Zool., 5, 117 (1970).
- DADD, R.H., Ann. Rev. Entomol., 18, 381 (1973).
- D'COSTA, MARIO A., ANGEL, A., J. Clin. Inv. 55 (1), 138-48 (1975).
- DESNUELLE, P., Lypases, Enzymes, 3rd Ed. 1972, 7, 575-616 (1972).
- DIRINGER, H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 577-582 (1973).
- DITTMER, J.C., LESTER, R.L., J. Lip. Res., 5, 126 (1964).
- DOLE, V.P., MEINERTH, H., J. Biol. Chem., 235, 2595 (1960).
- DUJOVNE, C.A., WEISS, P., BIANCHINE, J.R., Clin. Pharmacol. Ther. 12, 117 (1971).
- DUMAS, J.C.D., R. Soc. Biol., 166 (2-3), (1972).

DUNCAN, C.H., BEST, M.M., J. Lip. Res., 1, 159 (1960).

DUNCAN, C.H., BEST, M.M., DESPOPOULLOS, A., Circulation, 30
(3), 111-117 (1964).

DUNCAN, C.H., BEST, M.M., Circulación, 40, 111 (1969).

EATON, R.P., Metabol. Clin. Exp., 22 (6), 763-7 (1973).

EATON, R.P., Metabol. Clin. Exp., 23 (5), 445-54 (1974).

EINARRSON, F., Biochem. Pharmacol., 23 (1), 13-19 (1974).

EMMER, M., de CROMBRUGGHE, B., PASTAN, I., PERLAMN, R.L., -
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 66, 480 (1970).

EMMERICH, H., Gen. Comp. Endocrinol, 19, 543 (1972).

FALLON, H.J., Lipids, 7 (2), 106-9 (1972).

FAST, P.G., Mem. Entomol. Soc. Can., 37, 1 (1964)

FAST, P.G., Lipids, 1, 209 (1966).

FAST, P.G., Progr. Chem. Fats. Other Lipids., 11 (2), 181 -
(1970).

FENDERSON, R.W. Jr., Amer. J. Clin. Nutr. 27, (1), 22-8 (1974).

FERNANDEZ-SOUSA, J.M., MUNICIO, A.M., RIBERA, A., Biochem. -
Biophys. Acta, 248, 226-233 (1971).

FERNANDEZ-SOUSA, J.M., MUNICIO, A.M., RIBERA, A., Biochem. Bio
phys. Acta, 231, 527 (1971).

FISHER, J.N., BALL, E.G., Biochemistry, 6, 637 (1967).

FOSTER, D.W., Mc WHORTER, W.P., J. Biol. Chem., 244, 260 =
(1969).

FULTON, J.E., J. Lip. Res., 13, 78 (1972).

FULTON, J.E., Jr., HSIA, J.L., J. Lip. Res., 13, 78-85 -
(1972).

- FYTIZAS, E., Meded. Fac. Landbouwwet., Rijksuniv. Gen.
40 (2, Pt. 1), 397-402 (1975).
- GALLI, C.E.D.D.G., PAOLETTI, R., Life Sci., 9 (2), 523-
 534 (1970).
- GANS, J.G., Biochem. Pharmacol. 20 (12), 3321-9 (1971).
- GANS, J.G., Biochem. Pharmacol. 23 (10), 2248-2256
 (1973).
- GEAR, A.R.L., J. Biol. Chem. 249 (20), 6495-504 (1974).
- GILBERT, L.I., SCHNEIDERMAN, H.A., Nature 184, 171 (1959).
- GILBERT, L.I., SCHNEIDERMAN, H.S., Gen. Comp. Endocrin.
1, 453-477 (1961).
- GILBERT, L.I., Adv. Insect. Physiol., 4, 69 (1967).
- GILBERT, L.I., Physiol. Insecta, 2nd. Ed. 1973, 1, 249-
 370, Ed. por Rockstein, Morris. Academic New
 York, N.Y.
- GILBERT, L.I., APPLEBAUM, S., GORELL, T.A., SIDALL, J.B.,
 SIEN, Y.C., Bull. Wld. Hlth. Org. 44, 397 (1971).
- GILBERT, L.I., O'CONNOR, J.D., Chem. Zool. (Ed. por Flor-
 kin, M., Scheer, B.T.) 54, 229-253. Academic -
 Press. London, (1971).
- GILBERT, L.I., Rec. Prog. Horm. Res. 30, (1974).
- GILMOUR, D., "Metabolism of insects", Univ. Rev. in Biol.
 S. Francisco, W.H. Freeman and Co, (1975).
- GOLBERG, V., DeMEILLON, G., Biochem. J., 43, 372 (1948).
- GOLDEBERG, H. HUETTINEN, M., KAMPFER, P., KRAMAR, R., PAVEL
 KA, M., Histochemistry, 43 (3), 186-199 (1976).
- GOODMAN, DeWITT, S., NOBLE, R.P., DELL, R.B., J. Clin. Inv.
52, 231-241 (1968).

- GOODMAN, D.S., NOBLE, R.P., DELL, R.B., J. Clin. Inv. 52,
2646-2655 (1973).
- GORIN, E., SHAFRIR E., Biochem. Biophys. Acta, 84, 24-34
(1964).
- GORIN, E., GOODMAN, H.M., Horm. Metabol. Res. 6, 146-150 -
(1974).
- GOULD, R.G., SWRYD, E.A., COAN, B.J., AVOY, D.R., J. Athero-
scler. Res. 6, 555 (1966).
- GRAFFNETTER, D. MRHOVA, O., JARNADA, J., Arch. Int. Pharma-
codyn. 190, 159-173 (1975).
- GREENSPAN, M.D., J. Bacteriol., 113 (2), 847-55 (1973).
- GREENSPAN, M.D., GEMMERSHAUSEN, J.II., MACKOW, R., Biochem.
Biophys. Acta, 380, 190-198 (1975).
- GREGOLIN, C., RYDER, E., KLEINSCHMIDT, A.K., WARNER, R.D., -
LANE, M.D., Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 56 -
1751-1758 (1966).
- GRIES, F.A., MISS, H.D., CANZLER, H., KOSCHINSKY, T., -
VOGELBERG, K.H., JANNKE, K., Advanc. Exp. Med. -
Biol., 26, 297 (1972).
- GRISON, D., Compt. Rend. 227, 1172 (1948).
- GRUNDY, S.M., AHRENS, E.H., Jr., MIETTINEN, T.A., J. Lip.
Res., 6, 397-410 (1965).
- GRUNDY, S.M., AHRENS, E.H., J. Lip. Res., 10, 91 (1969).
- GREENE, H.L., HERMAN, R.H., ZAKIM, D., Proc. Soc. Exp. -
Biol. Med., 134, 1035-8 (1970).
- GREENGARD, P., ROBISON, G.A., Adv. Cyclic Nucl. Res., 3,
Raven Press, N.Y. (1.973).

- HARWALKAR, M.P., RAHALKAR, G.W., Steril, Princ. Insect Control Proc. Symp., 1974 (Pub. 1975), 329-36.
- HAVEL, R.J., KANE, J.P., Ann. Rev. Pharm., 1973, 287-300.
- HAWKINS, R.A. Biochem. J., 140, (1) , 117-20 (1974).
- HENLY, A., Analyst, 82, 286, (1957).
- HESS, R.W., STANBLY, W., RIESS, V., Nature, 208, 856-8 - (1965).
- HIGHNAM, K.C., HILL, L., "The Comparative Endocrinology of the Invertebrates" Contemporary Biology. London (1969).
- HILL P., DVORNIK, D., Can. J. Biochem. 49, 903 (1972).
- HINTON, H.E., Proc. R. Entomol. Soc. London, 35, 55-64, (1971).
- HOLMES, W.L., Lipid Pharmacol., R. Paolett, Academic -- Press, N.Y. (1964).
- HOMCY, Ch. J., Atherosclerosis, 19 (3), 381-91 (1974).
- HORLICK, L., KUDCHOKAR, B.J., Circulation, 43, 299-309 - (1971).
- HORNING, E.C., FISCHER, E.P., JORDAN, G., Jr., Lipids 7, 114-120 (1972).
- HOOD, B., ANGERWALL, G., CRAMER, K., WELING, G., Acta - Med. Scand., 184, 337 (1968).
- HOUSE, H.L., BARLOW, J. Nutr., 72, 409 (1960).
- HOUSE, H.L., Can. Entomol., 97, 815 (1965).
- HOUSE, H.L., GRAHAM, A.R., Can. Entomol. 99, 994 (1967).

- HOUSE, H.L., *Physiol. Insecta* II, 13, 769, 1970, Academic Press, N.Y.
- HULCHER, F.H., *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 422 (1971).
- HUNNINNGHAKE, D.B., AZARNOFF, D.L., *Metabolism.* 17 (7), - 588-95 (1968).
- HUTTUNEN, J.K., STEINBERG, D., MAYER, S.E., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 67 (1), 290-295 (1970).
- HUTTUNEN, J.K., STEINBERG, D., *Biochem. Biophys. Acta*, - 239, 410 (1971).
- IP, C., TEPPERMAN, H.M., TEPPERMAN, J., *J. Lip. Res.* 17, 68 (1976).
- ISHIZAKI, H., ICHIKAWA, M., *Biol. Bull.*, 133, 355 (1967).
- JACOTOT, B., *Haemostasis*, 2 (1-4), 163-8 (1973).
- JEPSON, E.M., SMALL, E., GRAYSON, M. F., BANCE, G., BILLI-MORA, J.D. *Atherosclerosis*, 16, 9 (1972).
- JIMENEZ, C., MUNICIO, A.M., SUAREZ, A., *Lipids*, 10, 82 - (1975).
- JOLY, P., "Endocrinologie des Insectes", Ed. Masson et Ge., Paris (1968).
- JUNGALWALA, F.B., DAWSON, R.M.C., *Biochem. J.*, 117, 481-90 (1970).
- KATHER, H., SIMON-CRISAN, G., SIMON, B., *Horm. Metab. Res.*, (3), 246-7 (1976).
- KAHONEN, M.T., *FEBS Lett.*, 43, (3), 297-9 (1974).
- KAHONEN, M.T., *Biochem. Biophys. Acta*, 428, 690-701 (1976).
- KAPLAN, A., *Anal. Biochem.*, 33, 218-225 (1970).
- KARLSON, P., *Naturwissenschaften*, 53, 445 (1966).

- KATYAL, S.L., SAHA, J., KABAR, A.J. J., Biochem. Pharmacol 21, 747 (1972).
- KENNEDY, E.P., Fed. Proc. 20, 934-940 (1962).
- KINSELLA, J.E., Comp. Biochem, Physiol., 35, 647-653 (1970)
- KNIPLING, E.F., Science, 130, 902-904 (1959).
- KO, H., ROYER, M.E., Anal Biochem., 20, 205 (1967).
- KOKATNUR, M.G., MALCOM, G.T., MARTINEZ, R.D., Metabolism, 18, (1), 73-80 (1969).
- KOKATNUR, M.G.,MALCOM, G.T., Atherosclerosis, 12, 193 (1970).
- KOKATNUR, M.G., MALCOM, G.T., Metabolism, 19, (2), 120-8 - (1970).
- KRAMER, M., Orv. Metil. 116 (47), 2274-8 (1975).
- KRISHNAKANTHA, T., Biochem., 130(1), 167-75 (1972).
- KRISHNAKANTHA, T., Indian J. Biochem. Biophys.,10 (3), 224-7 (1973).
- KRISHNAKANTHA, T.P., Biochem. Pharmacol., 22 (10), 1245-7 - (1973).
- KRISHNAKANTHA, T.P., Indian J. Biochem. Biophys., 11 (1),- 51-3 (1974).
- KRISHNAKANTHA, T.P., Environ. Physiol. Biochem. 4, (5), - 243-250 (1974).
- KRISHNAKANTHA, T.P., Indian J. Biochem.Biophys. 12 (1), - 31-4 (1975).
- KRISHNAIAH, K.V., RAMASARMA, T., Biochem. J., 116, 321 (1970).
- KROEGER, H., Nature (London), 200, 1234 (1968).
- KUO, J.F., GREENGARD, P., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 64 1349 (1969).

- KUO, J.F., KRUEGER, B., SANS, J.R., GREENGARD, P., Bio--
chem. Biophys. Acta, 212, 79 (1970).
- KUO, J.F., WYATT, G.R., GREENGARD, P., J. Biol. Chem. -
246, 7159 (1971).
- LAKSHAMANAN, M.R., PHILLISP, W.E., J. BRIEN, R., J. Lip.
Res., 353 (1968).
- LAMB, R.G., FALLON, H.J., J. Biol. Chem., 247, 1281-87
(1972).
- LANDRISCINA, C., Biochem. Med. 12 (4), 356-64 (1975).
- LANGAN, T.A., Adv. Cyclic Nucleotides, 3, (1973).
- LEDFORD, D., Diss. Alstr. Int. 3, 34 (4) 1370 (1975).
- LEDFORD, J.H., ALAUPOVIC, P. Biochem. Biophys. Acta, 398.
132-148 (1975).
- LEENDERS, H.J., WULLENS, G.J., BERENDES, H.D., Exp. Cell
Res., 63, 159 (1970).
- LEVEY, G.S., Rec. Progr. Horm. Res. 29, 361-386 (1973).
- LEVINSON, H.Z., J. Insect Physiol., 8, 191 (1962).
- LEVINSON, H.Z., Bull. Res. Council Israel, IDE, 116-123
(1963).
- LEVINSON, H.A., GOTHIEF, S., Parasitol, 26, 19 (1965).
- LEVINSON, H.Z., Riv. Parasitol., 27, 47-63 (1966).
- LEVINSON, H.Z., BAREL, K., BAR ILAN, A.R., J. Stored -
Prod. Res., 3, 345 (1967).
- LEVINSON, H.Z., LEVINSON, A.R., Naturwiss. 60, 156 (1973).
- LEVINSON, H.Z., LEVINSON, A.R., J. Insect Physiol., 9, -
1727-1734 (1973).
- LEZZI, M., GILBERT, L.I., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.,
64, 498 (1969).

- LUFKIN, E.G., GREENE, H., MEEK, J.R., J. Lab. Clin. Med.
78, 820 (1971).
- LUFKIN, E.G., J. Lab. Clin. Med., 84 (5), 698-707 (1974).
- LYNEN, F., Fed. Proc. 20, 941-951 (1962).
- LYNEN, F., Biochem. J., 102, 381 (1967).
- MARAGOUidakis, M.E., Biol. Chem., 244 (18), 5005-5013 -
 (1969).
- MADARIAGA, M.A., MUNICIO, A.M., RIBERA, A., Comp. Biochem.
 Physiol., 33, 127 (1970).
- MADARIAGA, M.A., Municio, A.M., RIBERA, A., Comp. Biochem.
 Physiol., 35, 63-68 (1970).
- MAIET, R. MULLER, K., Adv. Exp. Med. Biol., 63, 349-57 -
 (1975).
- MANGOLD, H.K., MALINC, D.C., J. Am. Oil. Soc., 37, 383 -
 (1961).
- MATA, F., Tesis Doctoral, Universidad de Madrid, (1976).
- MCKERRON, C.G., SCOTT, R.L., ASPER, S.P., LEVY, R.I., -
 J. Clin. Endocrinol. 29, 957-961 (1969).
- MEINDERS, A.E., VAN LEEUWN, A.M., BORST, J.G., G., CEJKA,
 V., Clin. Sci. Mol. Med., 49 (4), 283-90 (1975).
- METCALFE, L.E., SCHMITZ, A.A., Anal. Chem., 33, 363 (1961).
- MISKER, D.H., JORDAN, P.T., KLING, P., McMILLAN, A., HUCKER,
 H.B. TOCCO, D.J., Thromb. Haemostasis, 35 (2), -
 358-63 (1976).
- MIYAMOTO, E., KUO, J.F., GREENLANRD, P., J. Biol. Chem. 244,
 6395 (1969).
- MIYAZAWA, S., SAKURAI, T., IMURA, M., HASHIMOTO, T., J. Biol
 Chem. (Tokyo), 78 (6), 1171-6 (1975).

- MONOD, J., CHANGEUX, J.P., JACOB, F.J. Mol. Biol, 6.
309-329 (1963).
- MORISHIMA, I., J. Insect Physiol., 19, 2261 (1973).
- MORISHIMA, I., Biochem. Biophys. Acta, 227-241 (1974).
- MRHOVA, O., Biochem, Pharmacol., 20 (11), 3069-76 (1971).
- MRHOVA, O., GRAFFNETTER, D., JANDA, J., LINHART, J., Bio-
chem. Pharm. 20, 3069 (1971).
- MULLA MIR, S., KRAMER, W.L., BARNARD, Don R., J. Econ. -
Entomol., 69 (2), 285-91 (1976).
- MUNICIO, A.M., ODRIUZOLA, J.M., PIÑEIRO, A., Comp. Biochem.
Physiol., 37, 387-395 (1970).
- MUNICIO, A.M., ODRIUZOLA, J.M., PIÑEIRO, A., RIBERA, A., -
Biochim. Biophys. Acta., 248, 212-225 (1971).
- MUNICIO, A.M., ODRIUZOLA, J.M., PIÑEIRO, A., RIBERA, A., -
Biochim. Biophys. Acta. 280, 248-257 (1972).
- MUNICIO, A.M., ODRIUZOLA, J.M., RAMOS, J.A., Insect Biochem.
2, 353-360 (1972).
- MUNICIO, A.M., ODRIUZOLA, J.M., RAMOS, J.A., Insect Biochem.
3, 359 (1973).
- MUNICIO, A.M., ODRIUZOLA, J.M., PIÑEIRO, A., RIBERA, A., -
Insect Biochem., 3, 19-29 (1973).
- MUNICIO, A.M., ODRIUZOLA, J.M., PEREZ-ALBARSANZ, M.A., RA-
MOS, J.A., Biochem. Biophys. Acta, 360, 289-297
(1974).
- MUNICIO, A.M., GARCIA, R., PEREZ-ALBARSANZ, M.A., Eur. J.
Biochem., 60, 117-121 (1975a).
- MUNICIO, A.M., ODRIUZOLA, J.M., PEREZ-ALBARSANZ, M.A., -
Eur. J. Biochem., 60, 123-128 (1975b).

- NAVAB, G.H.A., KEISER, I., Steril. Princ. Insect. -
Control., Proc. Symp. 1974 (Pub. 1975), -
325-8.
- NAZARETH, R.I., J. Pharm. Sci., 63 (2), 203-11 (1974).
- NELSON, G.H., Amer. J. Obst. Gyn. 112, 827 (1972).
- NIEMIERIKO, S., WOLDAVER, P., WOJTCZAK, A.F., Acta. -
Biol. Exptl., 17, 255-276 (1956).
- NUGTEREN, D.H., Biochem. Biophys. Acta, 196, 280-290
(1965).
- OGSTON, D., Atherosclerosis, 16 (2), 273-6 (1972).
- OLIVER, M.F., The Lancet, 1, 1321 (1962).
- PALLOS, F.M., LETCHOWORTH, P.E., MENN, J., J. Agric.-
Food Chem., 24 (2), 218-21 (1976).
- PAN, H.Y., Pharmacology, 12 (1), 48-56 (1974).
- PANINI, S.R., Biochem. Biophys. Acta, 368 (1), 29-38
(1974).
- PANINI, S.R., Arch. Biochem. Biophys., 168 (1), 188-197
(1975).
- PANTALEONI, G.C., Clin. Ter., 69 (4), 321-8 (1974).
- PLATT, D.S., COCKRILL, B.L., Biochem. Pharmac. 18, 429
(1969).
- POLACHEK, A.A., HATZ, H.M., LITTMAN, M., Adv. Exp. Med.
Biol., 26, 316 (1972).
- POPJAK, G., CORNFORTH, R.H., CLIFFORD, K., Lancet, 1,
1270 (1960).
- POWANDA, M.C., CANONICO, PETER, G., Proc. Soc. Exp. -
Biol. Med., 52 (3), 437-40 (1976).

- POWANDA, M.C., HENRIKSEN, E.L., AYALA, E., CANONICO, P.G.,
Biochem. Pharmacol., 25 (7), 785-8 (1976).
- PRICE, G.M., Insect Biochem., 5, 53-60 (1975).
- PYKALISTO, O.J., VOGEL, W.C., BIEMAN, E.L., Biochim. Biophys. Acta, 369, 254-263 (1974).
- QUAGLIARIELLO, E., Biochem. Soc. Transact. 2 (6), 1215-18 (1974).
- REDDY, G., J. Insect Physiol., 19 (4), 773-780 (1973).
- REDDY, J., SVOBODA, D., AZARNOFF, D., Biochem. Biophys. Res. Comm., 52, 537-543 (1973).
- REIMANN, E.M., BROSTROM, C.O., CORIN, J.D., KING, C.A., -
KREBS, E.G., Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, -
187 (1971).
- REIMANN, E.M., WALSH, D.A., KREBS, E.G., J. Biol. Chem. 246,
1986 (1971).
- ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W., Cyclic. AMP,
Academic Press, N.Y., (1971).
- ROJAKOVICK, A.S., MARCH, R.D., Comp. Biochem. Physiol., 43N,
209 (1972).
- ROJAKOVICK, A.S., MARCH, R.B., Comp. Biochem. Physiol., 47B,
189 (1974).
- RODBARD, D., BRIDSON, W., RAYFORD, P.L., J. Lab. Clin. Med,
4, 770-78 (1969).
- RODBELL, M.J., Biol. Chem., 239 (2), (1964).
- RODBELL, M.R., Progr. Horm. Res., 24, 215-247 (1968).
- RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., DRANS, M.J., Proc. -
IV Capri Conf. Diabetes, Acta. Diabetologia Latina,
7, II Ponte, Milan, 9 (1970).

- RODBELL, M., BIRNBAUMER, C., POHL, L., J. Biol. Chem.,
245, 718 (1970).
- RUSSELL, D.H., Biochem. Pharmacol. 20 (12), 3481-91 -
(1971).
- RUSSELL, T.R., TERHASAKI, W.L., APPLEMAN, M.H., J. Biol.
Chem., 248, 1334-1340 (1973).
- SACKTOR, B., Adv. Insect Physiol, 7, 280-323 (1974).
- SAITO, R., Nutr. Rep. Int., 12 (2), 87-92 (1975).
- SEDEE, P. D.J.W., Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., 3, -
262 (1956).
- SEGAL, F., J. Clin. Inv., 51 (7), 1632-8 (1972).
- SEGAL, P., ROHEINM, P.S., EDER, H.A., J. Clin. Invest.,
51, 1632-38 (1972).
- SCHAFFNER, F., Gastroenterology, 57 (3), 253-5 (1969).
- SCHNEIDER, J., KAFFARNIK, H., Atherosclerosis, 21, 455-57,
(1975).
- SCHWARTZ, J.P., JUNGAS, R.L., J. Lip. Res. 12, 553 (1971).
- SCOTT, P.J., HURLEY, P.J., J. Atheroscler. Res., 9, 25-34
(1969).
- SKIDMORE, W.G., J. Lip. Res., 3, 356 (1962).
- SIMS, R.P.A., LAROSE, J.A.G., J. Am. Oil. Chem. Soc. 39, -
232 (1962).
- SMITH, C.N., SUPP. BULL. WLD. HLTH, ORG. 29, 99-106 (1963).
- SMITH, C.N., LA BRECQUE, G.C., BORKOVEC, A.B., ANN. REV.
ENTOMOL, 9, 269-284 (1964).
- SNYDER, F., Anal. Biochem., 9, 183 (1964).
- SOCHA, R., J. Insect Physiol., 19 (7), 1449-53 (1973).

- SODERLING, T.R., HICKENBÖTOM, J.P., REIMAN, E.M., HUNKE-
LER, F.L., WALSH, D.A., KREBS, E.G., J. Biol.
Chem. 245, 6317 (1970).
- SODERLING, T.R., CORBIN, J., D., PARK, C.R., J. Biol. -
Chem. 248 (5), 1822-1829 (1973).
- SODHI, H.S., KUDCHODKAR, B.J., HORLICK, L., Metabolism. -
20 (3), 309-318 (1971).
- SODHI, H.S., Atherosclerosis, 17 (1), 1-19 (1973).
- SOLBERG, H.E., Biochim. Biophys. Acta, 280 (3), 434-9 -
(1972).
- SPENCER, I.M., CARDY, D.J., Insect Biochem., 6, (3), 289-
96 (1976).
- SPREAFICO, P.L., FRANDOLI, G., TURAZZA, G., Arzneim. Forsch.
23, 236 (1973).
- SRIDHARA, S., BHAT, J.V., Life, 4, 167 (1965).
- STEINBERG, D., en Progress in Biochemical Pharmacology -
(Ed. por D. Kritchevski, R. Paoletti, D. Stein-
berg, S. Kargel). Basel (1967).
- STEINER, R.F., ROHWER, G.G., J. Econom. Entomol., 54, 30
(1961).
- STEPHEN, W.F., GILBERT, L.I., J. Insect Physiol. 15, 1833
(1969).
- STEPHEN, W.F., GILBERT, L.I., J. Insect Physiol. 16, 851
(1970).
- SUKUMAN, T., Pesticides, 10 (1), 28-30 (1976).
- SUDILOWSKY, O., PITOT, H.C., Proc. Soc. Expt. Biol. Med.
144, 113-121 (1972).

- SUDILOWSKY, O., Biochem. Biophys. Res. Comm. 58 (1),
85-91 (1974).
- SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W., Pharmacol. Rev., 12, 265
(1960).
- SUTHERLAND, D.J., Nat. Cancer Inst. Monogr., 31, 433-45
(1969).
- SUTHERLAND, O.R.W., N.Z. Jl. Sci., 14, 18-24 (1971).
- TAKAHASHI, R.M., MIURA, T., Proc. Pap. Ann. Conf. Calif.
Mosq. Control Ass., 43, 85-7 (1975).
- TAKAYASU, K., Jap. Circ. J., 35 (9), 1059-69 (1971).
- THORP, J.M., The Lancet, 1, 1323-26 (1962).
- THORP, J.M., WARING, W.S., Nature, 194, 948 (1962).
- THORP, J.M., J. Atheroscler. Res., 3, 351 (1963).
- THORP, J.M., in "Absorption and distribution of drugs" -
(Ed. T.B. Bimms) 64, Livingstone, Edinburgh -
(1964).
- THORP, J.M., COTTON, R.C., OLIVER, M.F., Progr. Biochem.
Pharmacol., 4, 611-17 (1968).
- THORP, J.M., Atheroscl. Proc. Int. Symp. 2nd. 1969 (pub.
1970), Ed. por Jones, R.J., Springer, N.Y.
- THORP, J.M., Proc. XIII Meet. Eur. Soc. Study Drug Toxicity,
98 (1971).
- THOMAS, K.K., GILBERT, L.I., Insect Physiol, 13, 963 (1967).
- THOMSEN, E.J., Expt. Biol., 29 (1), 137-72 (1962).
- TIETZ, I., J., Med. Sci., 5, 1007 (1969).
- TOLMAN, E.L., TEPPERMAN, H.M., TEPPERMAN, J. Amer. J. Physiol.,
218 (4), 611-617 (1968).
- VAGELOS, P.R., MAJERUS, P.W., LARRABES, A.R., DILHAUD, C.P.
Fed. Proc. 25, 1485 (1966).

- VAN HANDEL, E., LEA, H., Gen. Comp. Endocrinol, 14 -
381 (1970).
- VAN HANDEL, E., LUM, P.T., Science, 134, 1797-1980 -
(1.961).
- VAN DEN BOSCH. H., Ann. Rev. Biochem., 846, 243-277 -
(1.974).
- VAUGHAN, M., BERGER, J.E., STEINBERG, D., J. Biol. Chem.,
239, 401 (1964).
- VEDECKIS, W.V., GILBERT, L.I., J. Insect Physiol., 19, -
2445-2457 (1973).
- VOLPE, J.J., MARASA, J.C., Biochim. Boyphys. Acta, 380,
454-472 (1975).
- WADA, T., Jap Circ. J., 37 (8), 935-9 (1973).
- WAKIL, S.J., J. Lip. Res. 2, 1 (1961).
- WAKIL, S.J. Proc. Int. Congres. Biochem. 5th., 1961, p. 3
(1963).
- WAKIL, S.J., GOLDMAN, J.K., WILLIAMSON, I.P., TOOMEY, R.
R.E., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 65, 880 -
(1966).
- WALSH, D.A., PERKINS, J.P., KREBS, E.G., J. Biol. Chem.,
243, 3763 (1968).
- WALSH, M.R., TEAL, S.W., GAMBLE, W., Arch. Biochem. Bio-
phys., 130, 7 (1969)
- WALKER, P.J., Insect Physiol., 17 (5), 813-21 (1971).
- WEIDHAAS, D.E., McDUFFIE, W.C., Bull. ENTOMOL. SOC. AMER.,
9, 268-272 (1963).

- WEINTRAUB, H., TIETZ, A., Biochim. Biophys. Acta, 306, -
(1), 31-41 (1973).
- WELLINGTON, W.G., Can. Entomol., 99 (3), 249-63 (1967).
- WESTERFELD, W.W., RICHERT, D.A., RUEGAMER, W.R., Biochem.
Pharm., 17, 1003 (1968).
- WESTERFELD, W.W., Biochem. Pharmacol., 21 (8), 1117-25 -
(1972).
- WHAYNE, T.F. Jr., J. Med. Chem., 16 (3), 228-31 (1973).
- WHITMORE, E., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 69, 1595-
1995 (1972).
- WHITE, L.W., Atheroscler. Proc. Int. Symp. 2nd, 1969 -
(Pub. 1970), 545-9, Ed. por Jones, R.J. Sprin-
ger, N.Y.
- WHITE, L., SMITH, P.G., J. Pharm. Exp. Ther. 178 (2),
361-370 (1971).
- WHAYNE, T.F., WITIAK, D.T., J. Med. Chem. 16, 228 (1973).
- WILLIAMS, C.M., Nature 178, 212 (1956).
- WILLIAMS, C.M., Biol. Bul., Woods Hole, 121, 572, (1961).
- WILLIAMS, S., Eur. J. Biochem., 17, 32-38 (1970).
- WIGGLESWORTH, V.B., Princ. Insect Physiol., Academic -
Press, N.Y., 6th, 741 (1965).
- WITTE, E.C., Progress in Medicinal Chemistry, 11, (Ed. -
G.P. West. North-Holland, 1975).
- WOLFE, B.M.J., AHALT, B., BERCK, J.D., RUBINSTEIN, D., -
Can. J. Biochem., 48, 170 (1970).
- WOLFE, B.M., KANE, J.P., HAVEL, R.J., BREWATER, H. P.,
J. Clin. Invest., 52, 446 (1973).

·YEH, R., KABARA, J., J. Life Sci., 11 (14) (pt.2), -
709-16 (1975).

YURKIEVICZ, W.J., HENNIGER, M.J., Comp. Biochem. Physiol.,
35, 757-759 (1970).

ZAK, B. Muss. N., BOYLE, A.J., ZLTKIS, D., Anal. Chem.,
26, 776 (1954).

ZILVERSMIT, D.G., J. Lip. Res., 9, 180 (1968).

ZILVERSMIT, D.B., HUGHES, L.B., REMINGTON, M., J. Lip. -
Res, 13, 750 (1972).